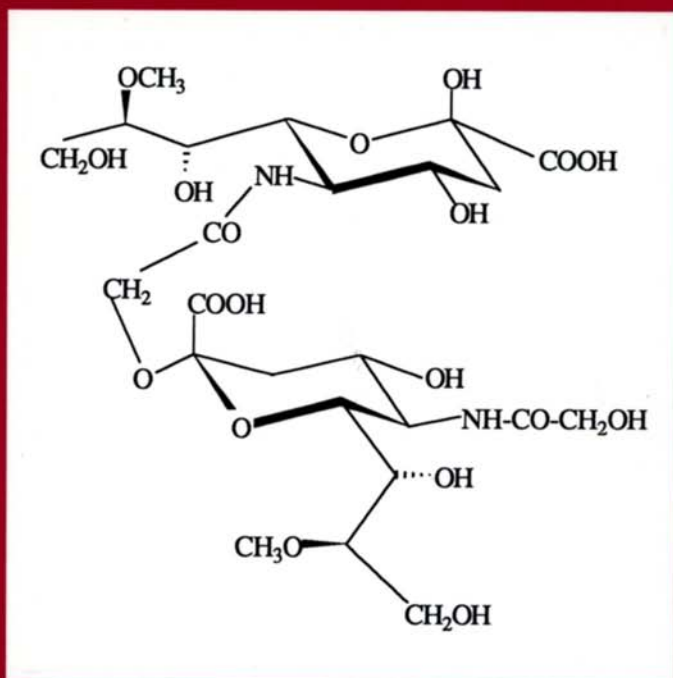


Serge David

Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres

Introduction chimique aux glycosciences



S A V O I R S A C T U E L S

InterÉditions / CNRS Éditions

Chimie moléculaire
et supramoléculaire
des sucres

Serge David
Université Paris-Sud, Orsay

Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres

Introduction chimique aux glycosciences

S A V O I R S A C T U E L S

InterÉditions / CNRS Éditions

L'illustration de la couverture est la formule d'un acide sialosyl sialique, disaccharide atypique, présent dans l'étoile de mer *Asterias rubens* (d'après A. Bergwerff, S. Hulleman, J. Kamerling, J. Vliegenthart, L. Shaw, G. Reuter et R. Schauer, *Polysialic Acid, from Microbes to Man*, ouvrage collectif publié sous la direction de J. Roth, U. Rutishauser et F.A. Troy II, Birkhäuser Verlag, Bâle, 1993, page 201).

© **1995, InterÉditions**, 7, rue de l'Estrapade, 75005 Paris
et
CNRS Editions, 20/22, rue Saint-Amand, 75015 Paris.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

Des photocopies payantes peuvent être réalisées avec l'accord de l'éditeur. S'adresser au : Centre français d'exploitation du droit de copie, 3, rue de Hautefeuille, 75006 Paris. Tél. (1) 43.26.95.35.

ISBN 2 7296 0528 2
ISBN 2 271 05254 8

Table des matières

Introduction	1
1 Configuration des monosaccharides	4
1.1 Le glucose	4
1.2 Autres configurations des sucres	7
1.3 Tautomérie	10
1.3.1 Généralités	10
1.3.2 Chromatographie en phase vapeur	11
1.3.3 Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC)	11
1.3.4 Dichroïsme circulaire	12
1.3.5 Résonance magnétique nucléaire	13
1.3.6 Résultats et discussion	14
1.4 Cinétique de la mutarotation	15
1.5 Considérations générales sur ces mesures	18
Références	19
2 Conformation des monosaccharides et de leurs dérivés	20
2.1 Symboles de conformation : pyranoses	20
2.2 Conformations à l'état solide	21
2.3 Conformation en solution : résonance magnétique nucléaire du proton	22
2.4 Généralités sur les facteurs de conformation des monosaccharides	26
2.5 Effet de coplanarité	27
2.6 Effet anomérique	30
2.6.1 Données expérimentales	30
2.6.2 Origine de l'effet anomérique	32
2.7 Conformation des pentopyranoses	37
2.8 Conformation des hexopyranoses et de leurs dérivés	39
2.9 Furanoses	41
2.10 Polyols non cycliques	43
Références	44
3 Alkyl et aryl glycosides. Glycosylamines	45
3.1 Définitions relatives aux glycosides (O-glycosides)	45
3.2 Synthèse des alkyl glycosides par la méthode de Fischer	46
3.2.1 Aspect expérimental	46
3.2.2 Rôle préparatif et limites d'utilité	47

3.3	Autres méthodes de préparation des glycosides	49
3.3.1	Activation du carbone anomérique	49
3.3.2	Aryl glycosides	50
3.4	Anhydropyranoses et anhydrofuranoses à caractère acétalique	51
3.5	Propriétés chimiques des glycosides	54
3.5.1	Hydrolyse en milieu acide	54
3.5.2	Hydrolyse et transfert enzymatiques	58
3.5.3	Stabilité des glycosides dans les conditions neutres ou alcalines. Rôle protecteur	61
3.6	Glycosylamines et nucléosides	62
3.6.1	Généralités	62
3.6.2	Glycosylamine	63
3.6.3	Nucléosides	66
	Références	69
4	Nomenclature	71
4.1	Introduction	71
4.2	Nomenclature des aldoses	71
4.2.1	Noms courants des sucres et symboles de configuration	71
4.2.2	Sucres désoxygénés	73
4.2.3	Sucres substitués par NRR', F, Cl, Br, I, N ₃ , alkyl-S et phényl-S	74
4.2.4	Dérivés substitués sur l'oxygène	74
4.2.5	Formes acycliques	75
4.2.6	Formes cycliques	75
4.2.7	Alditols	76
4.2.8	Acides aldoniques	77
4.2.9	Acides uroniques	77
4.2.10	Acétals cycliques	77
4.2.11	Acétals et thioacétals	78
4.2.12	Anhydrides intramoléculaires	78
4.3	Cétoses	79
5	Réactions des hydroxyles	80
5.1	Dérivés fonctionnels	80
5.1.1	Importance des réactions de protection	80
5.1.2	Éthers	80
5.1.3	Dérivés silylés	82
5.1.4	Esters d'acides organiques et carbonates	82
5.1.5	Éthérification et acylation sélectives. Dérivés organostanniques	83
5.1.6	Phosphates	85
5.1.7	Hydrogénosulfates	86
5.2	Acétals	86
5.3	Oxydations en carbonyle	89

5.3.1	Hydroxyles isolés	89
5.3.2	Oxydation des diols en hydroxycétones	90
5.3.3	Utilité synthétique des sucres carbonylés	91
5.3.4	Oxydations catalytiques sur platine	92
5.4	Periodates alcalins et tétraacétate de plomb	92
5.5	Désoxygénation	94
	Références	95
6	Réactions du carbonyle et de l'hémiacétal	97
6.1	Introduction	97
6.2	Oxydation par les halogènes	97
6.3	Réactifs nucléophiles	98
6.3.1	Borohydrure de sodium	98
6.3.2	Thiols	98
6.3.3	Cyanures alcalins	100
6.3.4	Réactifs du type de Wittig et organométalliques	101
6.4	Réactions impliquant la déprotonation en α du carbonyle.	
	Les sucres comme aldols	103
6.5	Fonctionnalisation radicalaire au centre anomérique	106
	Références	107
7	Changements de configuration. Sucres non saturés et ramifiés	108
7.1	Déplacement des hydroxyles alcooliques	108
7.2	Époxides	112
7.3	Les ions acyloxoniums cycliques	114
7.4	Déplacements nucléophiles avec participation	117
7.5	Sucres non saturés	117
7.5.1	Glycals	117
7.5.2	Réaction de Ferrier	119
7.6	Sucres ramifiés	120
7.6.1	Généralités	120
7.6.2	Famille $>C(OH)-R$	121
7.6.3	Famille $>CH-R$	122
7.6.4	Condensation aldolique	125
	Références	125
8	Les sucres en synthèse chirale	127
8.1	Induction asymétrique	127
8.1.1	Allylation et aldolisation énantiosélective	127
8.1.2	Cycloaddition	129
8.1.3	Réaction de Ugi	132
8.2	Les sucres comme précurseurs de séquences dans les synthèses de produits naturels	133
8.2.1	Considérations générales	133
8.2.2	Synthèse à partir des sucres	135
	Références	140

9 Les oligosaccharides : Configuration et analyse	141
9.1 Introduction, nomenclature	141
9.2 Effet exoanomérique	143
9.3 Détermination des séquences par les méthodes chimiques	147
9.3.1 Hydrolyse acide	147
9.3.2 Hydrolyse enzymatique	147
9.3.3 Analyse par méthylation	148
9.4 Détermination des séquences par les méthodes spectroscopiques	149
9.4.1 Spectrométrie de masse f.a.b	149
9.4.2 Technique d'injection dite « électrovaporisation »	151
9.4.3 Résonance magnétique nucléaire du proton	152
9.5 Efficacité potentielle des oligosaccharides pour le stockage et le transport de l'information	156
Références	156
10 Transformations chimiques et synthèse des oligosaccharides	157
10.1 Réactions des oligosaccharides	157
10.2 Couplage osidique non enzymatique : principes généraux	159
10.3 Pratique du couplage osidique	161
10.3.1 Réactions avec participation	161
10.3.2 Réactions SN2	162
10.3.3 Réactions faisant intervenir des intermédiaires cationiques	163
10.3.4 La création de la liaison équatoriale-axiale-1,2	165
10.3.5 Glycosidation cis-1,2 sans participation avec les sulfoxides	165
10.3.6 Effet de la configuration de l'accepteur	166
10.3.7 Thiooligosaccharides	169
10.4 Méthodes enzymatiques	169
10.4.1 Réaction de la galactosyltransférase	169
10.4.2 Généralisation	173
10.4.3 Glycosidases	174
10.5 Fluorohydrolyse	176
Références	176
11 Associations avec anions, cations et molécules inorganiques	177
11.1 Association avec des cations métalliques	177
11.1.1 Introduction	177
11.1.2 Structures à l'état solide	177
11.1.3 Complexes en solution	179
11.2 Notions sur la structure de l'eau liquide	182
11.2.1 Introduction	182
11.2.2 Structure de l'eau	182
11.3 Cyclodextrines	184
11.4 Amylose	187
11.5 Complexes iodés	188
11.5.1 Introduction	188

11.5.2 Complexes de l' α -cyclodextrine	188
11.5.3 Le complexe (paranitrophényl α -maltohexaoside) ₂ . Ba (I ₃) ₂ .27 H ₂ O	189
11.5.4 Complexe iodé de l'amylose	190
11.6 Interaction des sucres avec l'eau liquide	191
11.6.1 Importance du problème	191
11.6.2 Le modèle d'hydratation stéréospécifique des hexopyranoses	191
11.6.3 Principe des mesures	193
Références	197
12 Acides sialiques et oligosaccharides sialylés	198
12.1 État naturel	198
12.2 Préparations des acides sialiques	201
12.3 Couplage chimique	203
12.4 Couplage enzymatique	205
12.5 acides polysialiques	209
12.5.1 Introduction	209
12.5.2 Acides polysialiques microbiens	209
12.5.3 La molécule d'adhésion des cellules nerveuses, N-CAM	210
Références	212
13 Glycoconjugués	213
13.1 Glycolipides	213
13.1.1 Définitions, isolement	213
13.1.2 Glycolipides animaux	214
13.1.3 Gangliosides	214
13.1.4 Glycolipides végétaux	215
13.2 Glycoprotéines	216
13.2.1 Généralités	216
13.2.2 Protéines glycosides	216
13.2.3 Protéines glycosaminides	218
13.2.4 Problèmes conformationnels	220
13.3 Glycosaminoglycanes et protéoglycanes	222
13.3.1 Données générales	222
13.3.2 Chaînes périodiques ou quasipériodiques	223
Références	224
14 Structure de quelques complexes sucre-protéine cristallisés	225
14.1 Généralités. Le complexe ABP-L-arabinose	225
14.1.1 Protéines et sucres	225
14.1.2 Le complexe protéine ABP-L-arabinose	226
14.2 Complexe du maltose et de la protéine de transport de la maltodextrine	228
14.2.1 Description de la protéine complexante	228
14.2.2 Complexation des maltodextrines	229
14.2.3 Mode de complexation du maltose	230

14.3 Le complexe d'une lectine et d'un octasaccharide biantennaire	232
Références	235
15 Antigènes et anticorps. Lectines	236
15.1 Avertissement	236
15.2 Antigènes et anticorps	236
15.3 La réaction immunochimique in vitro	239
15.3.1 Haptènes	240
15.3.2 Physicochimie de la réaction immunochimique	241
15.4 Les lectines : définitions, extraction	245
15.4.1 Structure	246
15.4.2 Spécificité	248
15.4.3 Description abrégée de quelques lectines	249
15.4.4 Propriétés biologiques des lectines	251
15.4.5 Comparaison des anticorps anti-sucres et des lectines	251
Références	252
16 Les antigènes de groupes sanguins : substances A, B, H et connexes	253
16.1 Les antigènes A, B et H	253
16.1.1 Généralités. Polymorphisme	253
16.1.2 Types de jonction. Le système Lewis	254
16.2 Le système Ii et les effets de ramification	257
16.3 Synthèse des déterminants oligosaccharidiques	258
16.3.1 Déterminants ABH	258
16.3.2 Déterminants Ii	260
Références	263
17 Réactions de reconnaissance d'oligosaccharides importantes dans le monde vivant	264
17.1 Introduction	264
17.2 Le signal de nodulation des rhizobia	264
17.3 Le pentasaccharide actif de l'héparine	265
17.3.1 Isolement de l'héparine	265
17.3.2 Biosynthèse de l'héparine	266
17.3.3 Dégradation de l'héparine	267
17.3.4 Le pentasaccharide actif	268
17.4 Marqueurs tumoraux	271
17.4.1 Méthode de recherche	271
17.4.2 Antigènes tumoraux	272
17.5 Antigènes de différenciation	273
17.6 Les sélectines	275
17.6.1 Réaction inflammatoire et sélectines	275
17.6.2 Sélectines E	276
17.6.3 Sélectine L	278
17.6.4 Synthèse des ligands oligosaccharidiques des sélectines	278
Références	279

18 Y a-t-il une interaction de reconnaissance entre les oligosaccharides et l'ADN ?	280
18.1 Données du problème	280
18.2 Les synthèses du pseudo-oligosaccharide de la calichéamicine	283
18.2.1 Voie DCBAE	283
18.2.2 Voie EABCD	287
18.2.3 Méthodes alternatives	288
18.3 Reconnaissance du pseudo-tétrasaccharide par l'ADN	290
18.3.1 Rupture de un ou de deux brins	290
18.3.2 Efficacité comparée	290
18.3.3 Spécificité du site d'attaque	290
18.3.4 Conclusion	291
Références	291
Index	293

Introduction

A personne je ne souhaite autant une chute ou une attente forcée au pont-levis de Knippelbro etc... comme à ces enragés gens d'affaire pleins d'une infinité d'entreprises, alors que nous autres, quand le pont se lève, trouvons là une bonne occasion de choir dans nos pensées.

[...] Certes il est dur d'habiter un pays sans jamais de soleil sur l'horizon, mais il n'est guère drôle non plus d'habiter un endroit où le soleil vous tombe si verticalement sur le crâne qu'il ne nous permet, ni à nos entourages, de projeter quelque ombre.

Søren Kierkegaard

Journal (Extraits), 14 juillet 1837 (traduit du danois par Knud Ferlov et Jean-Jacques Gateau), Gallimard, 1942

Le découpage des connaissances adopté dans cet ouvrage n'est pas conforme à la tradition des livres de chimie organique. Manuels et traités décrivent essentiellement les techniques contemporaines de construction de liaison covalente, avec quelques développements sur les questions de conformation et, parfois, une brève allusion aux problèmes du monde vivant. Certes la chimie organique synthétique des sucres a fait des progrès considérables au cours des dernières décennies. La mise au point de nouvelles techniques et l'introduction de nouveaux concepts ont permis d'étendre à cette famille la plupart des grandes réactions. Des efforts intenses ont permis d'améliorer notablement le pronostic de la réaction de glycosidation, souvent inefficace avec la méthode ancienne. Aussi l'auteur a-t-il consacré la moitié du présent ouvrage à ces aspects synthétiques. Cependant, avec l'évolution actuelle des idées sur la recherche, limiter un ouvrage sur les sucres à la description des meilleures méthodes de construction de liaisons covalentes carbone-carbone et carbone-oxygène revient à laisser tomber la moitié du sujet. Il se trouve qu'un des axes privilégiés de la chimie organique contemporaine est l'étude d'associations entre molécules qui, tout en étant relativement stables, ne font pas intervenir de liaisons covalentes. Certaines de ces recherches se développent de façon totalement autonome par rapport au monde vivant. Or on rencontre précisément dans la chimie des oligosaccharides (voir le chapitre 9) un nombre important d'associations de ce type, essentiellement avec des récepteurs macromoléculaires présents dans les cellules vivantes, mais aussi avec des édifices minéraux. Certes la complexité des récepteurs organiques naturels rend l'analyse des modes de liaison assez conjecturale dans la majorité des cas, mais l'importance des phénomènes du monde vivant qui en dépendent justifie aux yeux de

l'auteur d'y consacrer la moitié de l'ouvrage, ou presque. Faute de quoi, il aurait passé sous silence un domaine scientifique en expansion rapide.

Enfin, de tout temps, les chimistes des sucres ont été très préoccupés de chimie physique. Que l'on songe à la tentative de mise en ordre de pouvoirs rotatoires, avec les moyens de l'époque, que représentent les règles de Hudson. Si elles sont presque oubliées – nous n'en dirons rien – l'esprit demeure, et la plupart des chimistes des sucres, bien qu'essentiellement penchés sur des problèmes de synthèse, jugent nécessaire un examen attentif de la physicochimie de leurs molécules, avec des moyens modernes, éventuellement les calculs *ab initio* et MM... Le lecteur trouvera, ici et là, et plus particulièrement aux chapitres 1, 2 et 9, une sélection des résultats modernes.

L'auteur espère que le panorama général dessiné dans son livre reflète fidèlement l'ambiance des principaux laboratoires de chimie des sucres et l'atmosphère des congrès et colloques spécialisés dans ce domaine. Nous sommes en présence d'une science qui ne s'est pas construite à partir d'un arsenal technique particulier, mais d'une famille assez homogène. On a proposé le terme de *glycoscience*. Il s'agit d'une démarche scientifique intéressante en elle-même, peut-être un modèle pour d'autres séries, indépendamment de ses prolongements manifestement anthropocentristes. On pourra objecter à l'auteur qu'un traité multi-auteur répondrait mieux à son objectif. Or ce livre n'est pas un traité, mais une tentative pour situer un ensemble de travaux dans une perspective exacte par des exemples caractéristiques. Les références ne constituent pas un palmarès de découvertes, mais l'indication d'une documentation supplémentaire d'accès commode, ou celle d'expériences à valeur pédagogique. Nous ajouterons que la rédaction par un seul auteur permet un traitement homogène. L'ossature de l'ouvrage est la chimie organique, ce qui nous semble justifié puisque, tôt ou tard, toutes ces interactions seront décrites en termes moléculaires. Il peut y avoir des justifications plus pratiques : par exemple, selon une information générale ^[1], une société américaine de biotechnologie particulièrement performante a dû néanmoins se rapprocher d'un grand groupe industriel en mesure de l'aider sur le plan de la chimie organique.

Pour ce qui a trait à la relation des sucres au monde vivant, nous avons mis l'accent sur des molécules à *distribution très large*, souvent universelle, avec une attention particulière aux *mécanismes généraux*. C'est la vision de la biochimie, qui nous a amené à exclure des domaines chatoyants, comme celui des antibiotiques aminoglycosidiques. Mais nous n'avons pas désiré faire un manuel de biochimie des sucres et, par exemple, nous ne parlons pas de l'élaboration, si caractéristique, de certaines unités oligosaccharidiques des glycoconjugués ^[2]. Nous nous sommes intéressé avant tout aux problèmes de l'homme et des animaux supérieurs. Cette restriction nous a amené à ne pas traiter, sauf exception, la structure si complexe et les problèmes d'une grande importance pratique des oligosaccharides microbiens. Les deux références citées concernent deux articles parmi les plus récents de deux écoles européennes actives dans ce domaine ^[3,4]. Nous terminerons ces considérations générales par un avertissement pratique : les dessins sont le plus souvent schématiques et ne doivent pas être utilisés comme une sour-

ce de données quantitatives. Pour celles-ci, le lecteur devra utiliser les nombreux tableaux de chiffres présents dans l'ouvrage.

La biosynthèse des protéines suit le code génétique. Les analogues des protéines dans le domaine des sucres sont les oligosaccharides. La jonction entre les unités monosaccharidiques est catalysée par des enzymes, les glycosyltransférases, évidemment codées. Mais, contrairement à ce qui se passe avec les acides aminés, on n'a jusqu'à présent aucune indication qu'il existe un code qui organise les séquences des monosaccharides dans les oligosaccharides. Simplement (si l'on peut dire !), les glycosyltransférases doivent se manifester au bon moment et au bon endroit. Est-ce que cela entraîne un certain flou dans la synthèse ? L'opinion diffuse a circulé dans les cercles de spécialistes qu'un certain désordre pourrait bien être avantageux pour un organisme, en tempérant l'excès de rigueur du code génétique. A notre connaissance, cette idée n'a pas encore été élaborée. Il reste que nombre de ces enchaînements ont une allure particulièrement rébarbative, et que le lecteur venant du monde coloré de la chimie des substances naturelles aura l'impression d'entrer dans une contrée aride et désordonnée, mais c'est que le sens de ces structures ne se dévoile que lentement, et cela suffit à les rendre passionnantes.

L'auteur remercie le professeur André Lubineau pour sa collaboration à la rédaction du paragraphe 17.6 consacré aux sélectines et à leurs ligands, et aux paragraphes 11.2 et 11.6 qui traitent de la relation intime, si évidente à tout le monde, et pourtant encore mystérieuse, entre le sucre et l'eau. L'aide de M^{me} Claudine Augé, directeur de recherche au CNRS, pour toutes les questions de chimie enzymatique préparative a été vivement appréciée. D'une façon générale, l'immersion de l'auteur au milieu d'un groupe actif lui a grandement facilité la collecte et la vérification de l'information. Enfin l'auteur remercie M^{me} Ten Feizi, du Medical Research Council, à Harrow (Angleterre), pour son aide à la rédaction des paragraphes 17.4 à 17.6 et le docteur Seni-tiroh Hakomori pour son aide à l'élaboration du chapitre 16.

RÉFÉRENCES

- [1] P. J. Raugel, *La Recherche*, 262 (1994) 224-233.
- [2] V. N. Shibaev, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 44 (1986) 277-339.
- [3] L. Kenne, B. Lindberg, M. Matibbur Rahman et M. Mosihuzzaman, *Carbohydr. Res.*, 243 (1993) 131-138.
- [4] F. I. Auzanneau, M. Mondange, D. Charon et L. Szabo, *Carbohydr. Res.*, 228 (1992) 37-45.

Configuration des monosaccharides

1.1 LE GLUCOSE

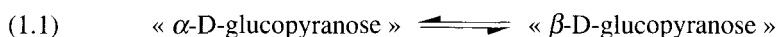
Le glucose est extrêmement soluble dans l'eau : on peut en dissoudre 0,5 kg dans 250 mL d'eau chaude. L'addition d'acide acétique à cette solution entraîne une précipitation lente de cristaux. C'est une des variétés tautomères, désignée en nomenclature officielle par le nom « α -D-glucopyranose » dont la signification exacte apparaîtra dans la suite du chapitre. La configuration de ce solide est connue avec une grande précision grâce à l'association des méthodes de diffraction de rayons X et de neutrons, qui donnent les 23 longueurs de liaison, les 42 angles de valence et les 68 angles dièdres de la molécule solide^[1]. Dans la représentation schématique **1.1** de cette configuration, les carbones 2 et 3 de la chaîne carbonée sont supposés en avant de la molécule, les carbones 1 et 4 sont dans le plan du papier. Les autres carbones et l'oxygène cyclique sont en arrière.

On reconnaît un cycle oxane (tétrahydropyrane) sur lequel sont greffés trois fonctions alcool secondaire en orientation équatoriale, une chaîne latérale portant une fonction alcool primaire et enfin un hydroxyle hémiacétalique porté par le carbone 1. Cet hémiacétal est intramoléculaire, provenant de l'addition de l'oxygène porté par C(5) sur une fonction aldéhyde.

A partir d'un échantillon quelconque de glucose, on peut préparer un isomère du composé **1.1** par le protocole suivant : recristallisation dans l'acide acétique, dissolution des cristaux dans l'eau glacée (100 mL pour 100 g), filtration et addition d'éthanol (0,5 L) à la solution filtrée, ce qui amène une précipitation rapide. Le solide obtenu a la configuration **1.2** à l'état solide^[2].

La seule différence avec la molécule **1.1** est dans l'orientation de l'hydroxyle hémiacétalique. La molécule **1.2** est tout équatoriale. Il y a donc une grande simplicité sous-jacente dans la configuration du D-glucose malgré son aspect rébarbatif pour le débutant. Cette observation peut être utile comme point de départ pour la mémorisation des structures de sucres. On appelle la molécule **1.2** « β -D-glucopyranose ».

Les isomères **1.1** et **1.2** sont en équilibre tautomérique en solution aqueuse, selon l'équation (1.1).



Ainsi le pouvoir rotatoire d'une solution aqueuse de l'isomère α -D, qui correspond à $[\alpha]_D^{20} + 112^\circ$ immédiatement après la dissolution décroît-il en quelques heures jusqu'à la valeur $52,7^\circ$. Réciproquement le pouvoir rotatoire de l'isomère β -D croît de $18,7^\circ$, valeur à la dissolution jusqu'à la même valeur d'équilibre. Une règle de mélange permet de calculer $[\alpha]/[\beta] = 38/62$. Le composé tout équatorial domine, mais nous verrons au paragraphe 2.6 qu'il faut s'abstenir d'y voir la confirmation des règles de l'analyse de conformation classique. Ce sont ces expériences qui ont permis la première observation de l'équilibre tautomérique (1.1) qui, pour cette raison, a gardé le nom de mutarotation.

Le spectre de RMN du proton dans l'eau lourde évolue de façon parallèle. Le proton H-1 porté par C(1), déblindé par deux oxygènes géminés, donne un signal à champs faible, séparé du groupe des autres protons, facile à repérer. Immédiatement après la dissolution, on observe sur le spectre de l' α -D-glucopyranose un doublet 3J 4 Hz, dû à un couplage équatorial-axial. Immédiatement après la dissolution, on observe sur le spectre du β -D-glucopyranose dans les mêmes conditions un doublet large 3J 8 Hz, dû à un couplage *trans* diaxial. On observe à l'équilibre la superposition de ces signaux (Fig. 1.1).

En fait, cette solution aqueuse contient d'autres tautomères, mais en concentration beaucoup trop faible pour se manifester en RMN de routine. Nous négligerons provisoirement leur existence. Il doit être clair que les tautomères **1.1** et **1.2** sont deux êtres chimiques distincts dont la différence ne se manifeste pas seulement dans les propriétés physiques, mais aussi dans la réactivité chimique et

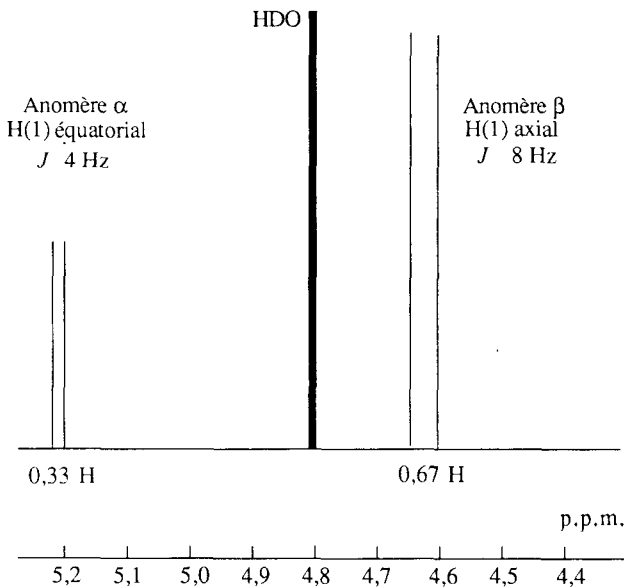
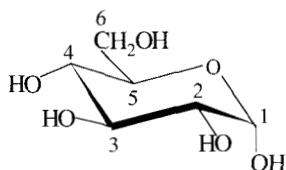
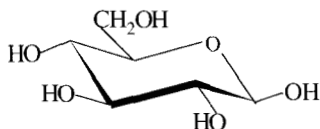


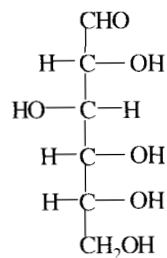
Figure 1.1 Signal RMN des protons anomériques H-1 des α - et β -D-glucopyranoses.



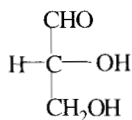
1.1



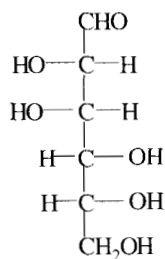
1.2



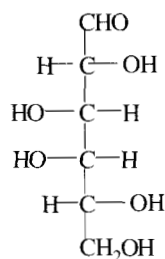
1.3



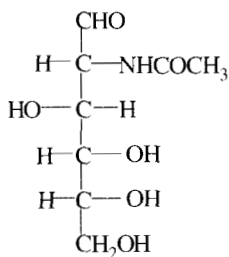
1.4



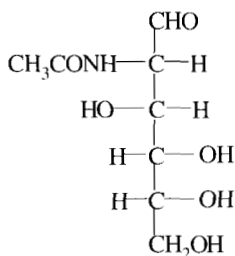
1.5



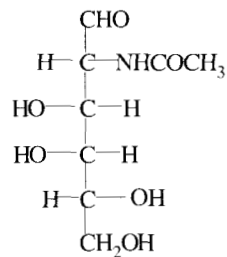
1.6



1.7



1.8



1.9

enzymatique. Cependant on voit que le carbone C(1) se distingue des autres par sa configuration instable. C'est pourquoi on lui a donné le nom particulier de *carbone anomérique*. On a traditionnellement représenté le glucose par le parent aldéhydique **1.3**, où il n'y a plus que des configurations stables. Mais ce tautomère n'est présent, en toute circonstance, qu'à une concentration infime.

L'aldéhyde **1.3** est dessiné avec la convention de Fischer. Les hydroxyles situés au-dessous du plan moyen de l'oxane sont à droite, l'hydroxyle situé au-dessus est

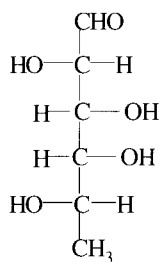
à gauche. Il y a une difficulté de passage pour le carbone 5 lié à la chaîne latérale. Le lecteur devra se souvenir que, dans la convention Fischer, les valences verticales s'éloignent et les valences horizontales se rapprochent de l'observateur. Il vérifiera alors que l'on peut appliquer les atomes lourds du D-glycéraldéhyde **1.4** sur la portion correspondant aux carbones 4, 5 et 6 des oxanes **1.1** et **1.2**.

1.2 AUTRES CONFIGURATIONS DE SUCRES

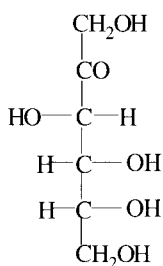
Il y a quatre carbones asymétriques dans la configuration **1.3**, il y a donc $2^4 = 16$ isomères, qui ont chacun leur nom. Le lecteur trouvera un tableau de ces sucres au chapitre 4, consacré à la nomenclature. On retrouve la majorité de ces configurations sous forme dérivée dans les cellules vivantes. Pour nous en tenir aux constituants généraux universellement répandus, nous citerons le D-mannose **1.5**, et le D-galactose **1.6**, épimères respectivement en 2 et 4 du D-glucose. Nous rencontrerons aussi fréquemment trois sucres où l'hydroxyle en C-2 a été remplacé par un groupement acétamido, désignés dans la pratique par les noms *N*-acétylglucosamine **1.7**, *N*-acétylmannosamine **1.8**, et *N*-acétylgalactosamine **1.9**. On observe aussi des molécules partiellement désoxygénées, comme le fucose **1.10**. Tous ces sucres à fonction aldéhyde latente ont reçu le nom général d'*aldoses*. Mais le carbonyle latent peut aussi être cétonique. On a alors les *cétoses*, tel le fructose **1.11**. Tous les sucres comportant une chaîne de six carbones non ramifiée ont reçu le nom général d'hexoses.

Il existe aussi des sucres à cinq carbones, les *pentoses*, dont deux représentants, le D-ribose **1.12**, et le désoxyribose (en nomenclature correcte, 2-déoxy-D-érythro-pentose) **1.13**, dépassent infiniment les autres en importance. Un sucre à neuf carbones, l'acide sialique **1.14**, rassemble sur la même chaîne un carboxyle, un carbonyle cétonique, cinq hydroxyles alcooliques et une fonction amide. On numérote les chaînes de sucres dans le sens qui attribue le chiffre le plus bas au carbone du carbonyle. Toutes ces molécules font partie du groupe des *monosaccharides*.

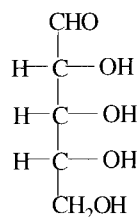
A l'exception du fucose, tous ces sucres présentent sur le carbone pénultième la même configuration que le carbone central du D-glycéraldéhyde. Ceci s'ex-



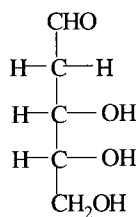
1.10



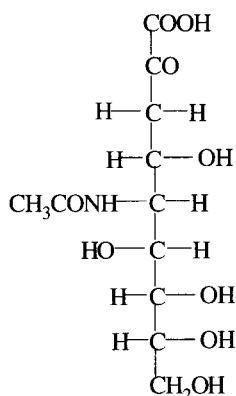
1.11



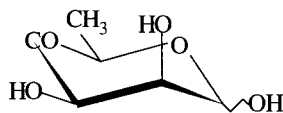
1.12



1.13



1.14



1.15

plique aisément, car les cellules vivantes les fabriquent tous à partir du D-glycéraldéhyde, et le trajet biosynthétique ne comporte à aucune étape une rupture entre le carbone central du D-glycéraldéhyde et ses quatre substituants. La figure 1.2 schématise l'arbre généalogique de ces monosaccharides. Le D-fructose résulte de la condensation aldolique de la dihydroxyacétone (partenaire nucléophile) sur le D-glycéraldéhyde. Il conduit soit au D-glucose soit au D-mannose par des modifications sur C(1) et C(2). Le D-glucose est épimérisé sur C(4) pour donner le D-galactose. Le même D-glucose perd C(1) et subit quelques transformations sur C(2) et C(3) pour donner le D-ribose (il existe une autre voie biosynthétique, le

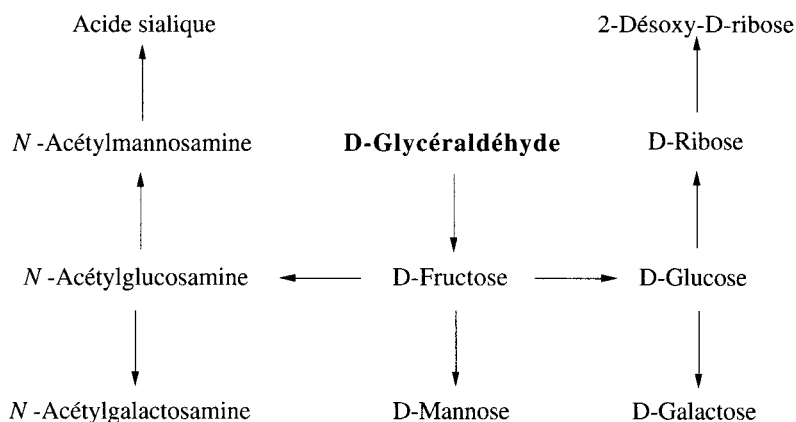


Figure 1.2 Filiation des principaux sucres de la série D.

cycle pentose-heptose, plus compliquée, mais qui n'implique pas le carbone pénultième). Le désoxyribose est fabriqué par désoxygénation du D-ribose sur C(2). L'amination du D-fructose, suivie d'acétylation donne la *N*-acétylglucosamine, épimérisée en *N*-acétylgalactosamine et *N*-acétylmannosamine. La condensation aldolique de l'acide pyruvique sur la *N*-acétylmannosamine donne l'acide sialique.

Seul parmi les sucres **1.5** à **1.14**, le fucose présente la configuration du L-glycéraldéhyde sur son carbone pénultième. Le précurseur biologique est le D-mannose. Il se forme un dérivé de structure **1.15** intermédiaire. Celui-ci subit des épimérisations en 3 et 5, conformes à l'intuition du chimiste organicien, puisque ces carbones sont contigus à un carbonyle, et la réduction en alcool du carbonyle. Il est peut-être significatif qu'on observe aussi la configuration du L-glycéraldéhyde sur le carbone pénultième d'autres sucres naturels désoxygénés en C(6). Pour éviter toute erreur d'interprétation, on doit souligner que les substrats réels des enzymes dans ces voies biosynthétiques *ne sont pas* les sucres libres, mais des phosphates, ou des phosphates complexes. Toutefois, ceci n'infirme en rien nos déductions.

Quittons la biochimie pour la géométrie. On a pris l'habitude de classer le D-glucose et ses quinze isomères de configuration stable en deux groupes de huit : la série D, où C(5) présente la configuration du D-glycéraldéhyde et la série L, où C(5) présente la configuration du L-glycéraldéhyde. On fait précéder le nom des sucres de la série D du préfixe D : D-glucose, D-mannose, etc. Les énantiomères de ces hexoses, qui appartiennent à la série L sont appelés L-glucose, L-mannose, etc. Enfin, lorsque dans un texte, ou un nom de dérivé de sucre en nomenclature officielle (voir le chapitre 4) on veut désigner la configuration, par opposition à la molécule, on emploie les symboles en italiques *D-manno*, *D-gluco*, *D-galacto*, *L-manno*, etc. dérivés des noms courants des sucres. Ces conventions s'étendent sans difficulté aux pentoses. Il y a huit pentoses, deux à deux énantiomères, répartis dans deux séries, D et L, selon que le carbone pénultième a la configuration du D-glycéraldéhyde ou la configuration opposée. La configuration du pentose D-ribose se désigne par *D-ribo*.

On remarquera que les mots « série D » et « série L » ne recouvrent pas la même réalité biologique suivant qu'il s'agit de sucres ou d'acides aminés. Les acides aminés des protéines, une vingtaine en tout, appartiennent exclusivement à « la série L des acides aminés ». Les séquences des oligosaccharides, architectures parallèles aux polypeptides dans les tissus (mais non directement codées), peuvent être bâties aussi bien de sucres D que de sucres L, quoique les premiers prédominent en général. On peut suggérer une explication : le carbone des acides aminés dont la configuration détermine la série est directement lié aux deux fonctions, amine et carboxyle, directement impliquées dans la liaison peptidique. En revanche, le carbone pénultième des sucres, dont la configuration fixe la série, est plutôt passif dans la création de la liaison entre monosaccharides, dite glycosidique.

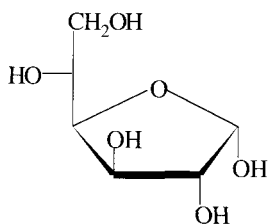
1.3 TAUTOMÉRIE

1.3.1 Généralités

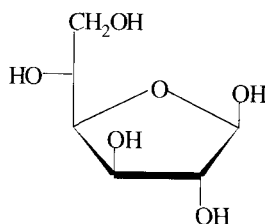
L'examen de la formule de l'aldéhyde **1.3** laisse prévoir *a priori* l'existence de six tautomères. Nous avons déjà rencontré les pyranoses **1.1** et **1.2**, qui résultent de l'attaque par l'oxygène O-5 de l'une ou de l'autre des faces de l'aldéhyde prochiral **1.3**. Mais nous n'avons pas de raison d'exclure la possibilité d'attaque par l'oxygène O-4, avec formation de deux tautomères comportant un cycle à cinq éléments, **1.16** et **1.17**. La stabilité d'un cycle à cinq éléments n'est pas très différente de celle d'un cycle à six éléments. A ce stade, nous allons terminer l'explication des termes introduits dogmatiquement au début du chapitre. Les sucres à cycle oxane (tétrahydropyrane) s'appellent des *pyranoses*, ceux à cycle oxolane (tétrahydrofurane) s'appellent des *furanoses*. Le symbole α est défini par référence au carbone pénultième. Une explication simple de cette convention repose sur la considération de l'hydrate du carbonyle, tel celui **1.18** correspondant au D-glucose. Sur le papier, on le transforme en furanose ou pyranose en remplaçant l'un des hydroxyles portés par C(1) par l'oxygène d'une fonction alcool portée par C(4) ou C(5). Si l'hydroxyle qui reste est formellement *cis* par rapport à l'oxygène du carbone pénultième, l'anomère est dit α . On voit que **1.16** et **1.17** sont respectivement l' α - et le β -D-furanose. Le cas des sucres à plus de six carbones est traité au paragraphe 4.2.6.

Il y a aussi lieu d'envisager la présence de l'aldéhyde libre dans le milieu et de son hydrate **1.18**, car on sait que les hydrates des aldéhydes α -hydroxylés sont relativement stables.

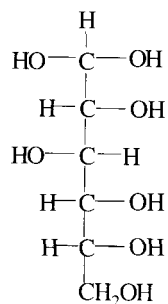
En fait, tous ces tautomères existent dans les solutions aqueuses, mais le plus souvent, certains d'entre eux sont présents à des concentrations trop faibles pour être visibles sans techniques sophistiquées. Par exemple, dans le cas du D-glucose, les tautomères autres que les α - et β -D-pyranoses ne sont présents qu'en quantité insignifiante. Le problème de la composition tautomérique à l'équilibre des solutions de sucres, généralement aqueuses, a suscité beaucoup d'intérêt^[3].



1.16



1.17

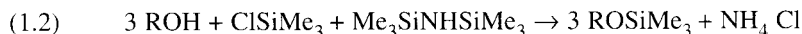


1.18

Contrairement à la tradition, qui donne aux mesures physiques la préséance sur l'isolement, nous allons traiter d'abord des méthodes séparatives, parce qu'elles font appel à des techniques très fondamentales de la chimie des sucres. Reconnaissons cependant qu'elles ne sont pas les plus puissantes dans le présent contexte. Bien sûr, il ne faut pas que l'isolement d'un tautomère modifie appréciablement l'équilibre. On utilisera donc des solvants où la mutarotation est lente, des réactions à basse température et des réactions de dérivation aussi rapides que possible.

1.3.2 Chromatographie en phase vapeur

Les sucres cristallisés sont extrêmement stabilisés dans les phases solides et liquides par un réseau de liaisons hydrogène, puisque chaque hydroxyle peut être éventuellement donneur ou accepteur. La destruction totale du réseau n'est pas possible à des températures inférieures à celle où s'amorce la décomposition de la molécule. Les sucres sont indistillables. La substitution de tous les hydrogènes acides par le groupement $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ supprime toute possibilité de liaison hydrogène. L'accumulation de groupements méthyle à la périphérie – quinze dans le cas du glucose – donne à la molécule la forme approximative d'une boule limitée par 45 atomes d'hydrogène neutres, de cohésion minimale. Bien que considérablement alourdie, la molécule devient volatile. Ainsi le dérivé de l' α -D-glucopyranose où tous les OH sont remplacés par $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ bout à 107-110°C sous 0,1 mm de Hg. On peut alors séparer rapidement les dérivés de sucres persilylés par chromatographie gazeuse. Dans un procédé habituel de silylation, on dissout le sucre (10 mg) dans la pyridine (1 mL) et on ajoute de l'hexaméthylidisilazane, $\text{Me}_3\text{SiNHSiMe}_3$ (0,2 mL) et du chlorotriméthylsilane (0,1 mL). Chaque hydroxyle est silylé selon l'équation (1.2). La réaction est normalement complète en 5 mn à température ambiante

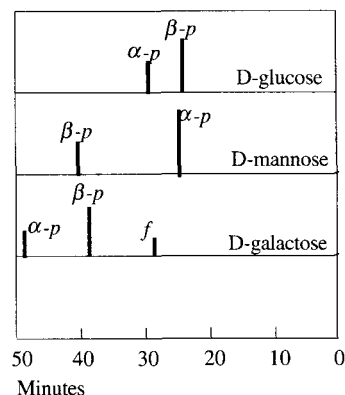


Pour suivre la mutarotation, le prélèvement (5 μL) est rapidement dissous dans la *N, N*-diméthylformamide et la solution refroidie dans l'azote liquide. On ajoute le mélange silylant, on laisse réchauffer et on injecte dans la colonne. Celle-ci, utilisée à 150-200°C, contient un remplissage d'un liquide à point d'ébullition élevé, adsorbé sur une phase solide pulvérulente. Avec cette méthode, on peut observer autant de pics sur le chromatogramme qu'il y a de tautomères en quantité appréciable en solution. Il y a un problème d'identification des pics, qui nécessite l'isolement des fractions en quantité appréciable.

1.3.3 Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC)

L'examen chromatographique direct des sucres libres, ou presque libres, en solution aqueuse, est une technique dont l'utilisation est en croissance rapide en chimie des oligosaccharides^[4]. L'adsorbant est sous forme de particules mono-

Figure 1.3 Séparation d'anomères par HPLC à 4°C, éluant : eau-acétonitrile (20:80 v/v). Ordonnées : absorption à 280 nm. Pour les autres conditions, voir le texte. Adapté d'après S. Honda, S. Suzuki et K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 317-325.



disperses, dont la dimension varie de 3 à 15 μ , dans des colonnes cylindriques analytiques de 10 à 15 cm. On utilise aussi des colonnes préparatives de dimensions 2,5 x 30 cm. L'écoulement n'est possible que sous des pressions variant de une à 300 atmosphères, et la durée de l'opération est de l'ordre de l'heure. On dose les sucres dans l'effluent par mesure des variations de conductance, d'indice de réfraction ou d'absorption ultra-violette. Ceci impose une extrême stabilité de toutes les conditions opératoires, si bien que la colonne est entourée d'éléments de régulation particulièrement dispendieux.

Entre autres phases stationnaires adaptées à ces séparations, on a décrit l'emploi de polystyrène-divinylbenzène sulfoné en sphères de diamètre strictement contrôlé (6 μ), qui remplissent une colonne de dimensions 6 x 150 mm. Cette résine échangeur de cations est employée sous la forme Ca^{++} . Le débit est 0,5 mL/mn. Dans ces expériences^[5], les auteurs ont dosé les sucres dans l'effluent par conversion en un dérivé absorbant à 280 nm, mais cela ne serait sans doute pas nécessaire avec un matériel plus moderne. La figure 1.3 donne les enregistrements obtenus avec le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose^[5].

Les furanoses α et β s'équilibrent trop rapidement pour qu'on puisse les séparer à 0-4°C, mais on a pu réaliser cette séparation entre -25 et -45°, avec des solvants spéciaux, sur le D-galactose et le fucose.

1.3.4 Dichroïsme circulaire

On a fait appel aux mesures de dichroïsme circulaire pour « voir » les tautomères carbonylés, particulièrement évanescents. Les composés carbonylés présentent une absorption vers 280 nm due à la transition $n\pi^*$ de la double liaison $\text{C}=\text{O}$. Le départ de cette bande est visible sur les solutions aqueuses de sucres, mais en raison de sa faible intensité, elle est largement masquée par un épaulement d'une bande beaucoup plus intense. Pour cette raison, on ne peut pas mesurer directement une extinction. Mais ce qui est caractéristique, c'est l'existence

Sucre	$10^3 \Delta\epsilon$	λ (nm)	Configuration du carbone alpha
D-ribose	- 0,469	285	<i>R</i>
D-galactose	- 0,170	287	<i>R</i>
D-glucose	- 0,0222	285	<i>R</i>
D-mannose	+ 0,0535	292	<i>S</i>
5,6-di- <i>O</i> -méthyl- D-glucose (1.19)	- 9,57	289	<i>R</i>
D-fructose	+ 6,72	273	<i>S</i>
1-deoxy-D-fructose (1.20)	+ 138	274	<i>S</i>

Tableau 1.1 Dichroïsme circulaire de sucres en solution aqueuse à 20°C. D'après L.D. Hayward et P.J. Angyal, *Carbohydr. Res.*, 53 (1977) 13-20 (publié avec l'aimable autorisation d'Elsevier Science).

d'un dichroïsme circulaire dans cette région, c'est-à-dire d'une différence d'extinction $\epsilon_G - \epsilon_D = \Delta\epsilon$ entre les lumières polarisées circulairement à droite et à gauche. Ceci vient de la présence d'un carbone asymétrique contigu au carbonyle. Nous donnons une sélection de résultats dans le tableau 1.1

Le tableau 1.1 montre d'abord que $\Delta\epsilon$ est positif quand la configuration du centre adjacent chiral est *S*, et négatif quand cette configuration est *R*. C'est une règle générale, vérifiée sur 33 exemples. On remarquera ensuite la différence considérable d'ordre de grandeur entre les sucres aldéhydiques non substitués et les sucres cétoniques, ce qui suggère que la concentration du tautomère carbonyle est beaucoup plus élevée avec ces derniers. On observe aussi une valeur élevée avec le 5,6-di-*O*-méthyl-D-glucose **1.19**. Ce dérivé ne peut pas exister sous forme pyranose, il est essentiellement en solution sous la forme furanose, mais l'augmentation très considérable de $\Delta\epsilon$ montre que la différence d'enthalpie libre entre aldéhyde et furanose est plus faible qu'entre aldéhyde et pyranose. Le désoxy sucre **1.20** donne pour le moment le record absolu de ces mesures. Probablement, la stabilité naturelle plus grande de la fonction cétone est renforcée par la suppression de l'effet inducteur de la fonction alcool. On ne peut pas utiliser ces mesures pour doser exactement les tautomères carbonyles parce qu'on n'a pas accès à la valeur de $\Delta\epsilon$ pour les composés purs. En prenant l'unité comme valeur approximative plausible, on obtient par le calcul des concentrations du même ordre que par les autres méthodes.

1.3.5 Résonance magnétique nucléaire

On peut étendre à tous les aldoses ce que nous avons dit sur le glucose. Les signaux des protons H-1 des différents tautomères en solution dans l'oxyde de deutérium apparaissent, à champs faibles, bien séparés des autres. La technique de

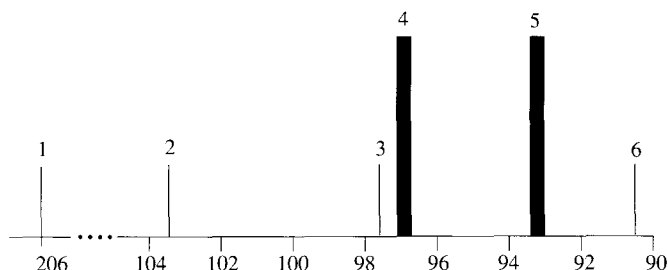


Figure 1.4 Spectre de RMN de ^{13}C du $[1 - ^{13}\text{C}]$ -D-glucose dans l'eau à 37°C . En abscisse : déplacements en ppm à partir de Me_4Si . En ordonnée : intensités qualitatives. Attribution des signaux : 1. aldéhyde ; 2. β -D-glucopyranose ; 3. α -D-glucopyranose ; 4. β -D-glucopyranose ; 5. α -D-glucopyranose ; 6. *gem*-diol. D'après S. R. Maple et A. Allerhand, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 3168-3169 (publié avec l'aimable autorisation de l'American Chemical Society).

RMN du proton, telle qu'elle est utilisée en routine dans les laboratoires de synthèse ne révèle que les signaux de l' α - et du β -pyranose dans les solutions de D-glucose et D-mannose, tandis que dans les solutions de D-galactose, deux autres pics, très peu intenses, révèlent la présence des deux furanoses. On peut voir le signal du carbonyle sur le spectre de RMN de ^{13}C d'une solution 4M de fructose^[3].

Pour aller au-delà on utilise la RMN de ^{13}C avec les sucres marqués par un procédé synthétique sur C(1), ce qui multiplie par 100 l'intensité du signal. Avec des procédés d'accumulation particuliers, et prolongés, on peut voir les six tautomères du D-glucose à 37°C . (Fig. 1.4). La disproportion des concentrations ne permet pas de les représenter de façon quantitativement valable, et le lecteur devra se rapporter au tableau 1.2.

L'utilisation de sucres marqués sur C(1) présente un autre avantage également très important : on peut observer les couplages avec C(1) des ^{13}C présents en faible abondance aux autres positions du sucre, ce qui dans le cas général n'est visible que pour les couplages 1J . On a donc ici un outil pour faciliter l'interprétation du spectre^[6,7]. Une simplification supplémentaire est réalisée avec la technique INADEQUATE, qui n'enregistre que les signaux dus aux carbones couplés à C(1). On peut adapter les paramètres de façon à ne retenir que les signaux des carbones séparés de C(1) par soit une, soit deux, soit trois liaisons, etc. Cette technique efface les signaux des carbones non couplés à C(1).

1.3.6 Résultats et discussion

Le tableau 1.2 donne la composition tautomérique de pentoses et d'hexoses en solution aqueuse ainsi que du 1-déoxy-fructose, **1.20**, et fructofuranose **1.6-**

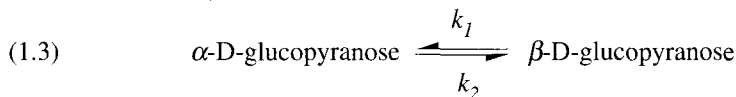
Sucre	t (°C)	Pyranose		Furanose		Aldé- hyde	Aldé- hydrol
		α	β	α	β		
D-Glucose	27	38,8	60,9	0,14	0,15	0,0024*	0,0045
D-Mannose	21	68,0	32,0				
D-Galactose	31	30	64	2,5	3,5	0,02	
D-Ribose	31	21,5	58,5	6,5	13,5	0,05	
2-Déoxy-D-érythro-pentose	30	40	35	13	12		
Fructose	31	2,5	65	6,5	25	0,8	
Fructofuranose- 1,6-diphosphate (1.21)	6			13	86	0,9	
1-Déoxy-fructose (1.20)	37	4	75	6	9	6**	

Tableau 1.2 Composition tautomérique de sucres dans D₂O. D'après S.J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 42 (1984) 15-68 ; 49 (1991) 19-35. (publié avec l'aimable autorisation d'Academic Press). (* : à 37°C ; ** : tautomère cétonique.)

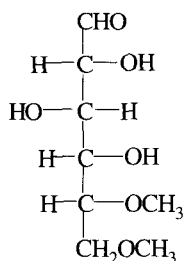
diphosphate, **1.21**. On observera la prédominance des pyranoses. Les galactofuranoses **1.22** ont une stabilité relative plus grande que celle des glucofuranoses **1.23**. Ceci est peut-être dû à la disposition *trans* de l'hydroxyle en C(3) et de la chaîne latérale dans les premiers. On observe aussi qu'il y a dix fois plus de β que d' α -pyranose dans les solutions de fructose. Nous allons ici anticiper sur le chapitre 2 consacré aux problèmes de conformation. On peut dessiner le β -D-fructopyranose sous une conformation **1.24** où l'on ne retrouve qu'une interaction défavorable, entre H-3 et OH-5. L'échange des substituants sur C(2) donne une conformation éminemment défavorable, qui bascule pour aboutir à **1.25**, le moindre mal, mais où subsistent encore de fortes interactions 1,3-diaxiales.

1.4 CINÉTIQUE DE LA MUTAROTATION

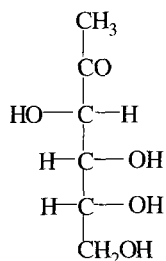
Dans le cas du D-glucose, il n'y a pratiquement que des pyranoses en solution. On peut formuler leur interconversion comme une réaction réversible du premier ordre (1.3), C_α et C_β étant les concentrations (activités) de chaque anomère. La vitesse de disparition est alors donnée par la relation (1.4), qui s'intègre de la façon habituelle. Il est commode de convertir les variations de concentration en variations de pouvoir rotatoire à une longueur d'onde déterminée, ce qui donne la relation (1.5), où r_0 et r_∞ représentent les rotations mesurées pour $t = 0$ et $t = \infty$.



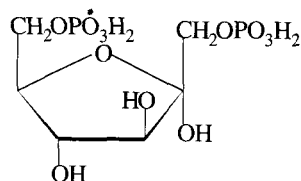
$$(1.4) \quad -\frac{dC_\alpha}{dt} = k_1[\alpha] - k_2[\beta]$$



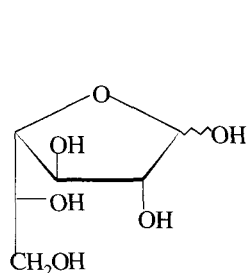
1.19



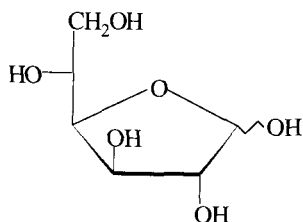
1.20



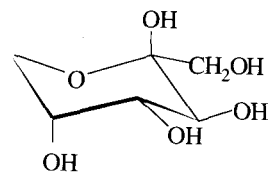
1.21



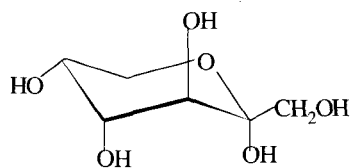
1.22



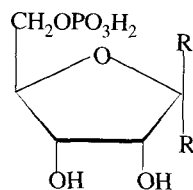
1.23



1.24



1.25



1.26 R = OH, R' = H

1.27 R = H, R' = OH

$$(1.5) \quad k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \log \frac{r_0 - r_\infty}{r_t - r_\infty}$$

Cette relation est vérifiée dans un grand nombre de cas^[8] La vitesse est multipliée par un facteur voisin de 2,5 pour une élévation de température de 10°C, ce qui correspond à une énergie d'activation voisine de 17 kcal mol⁻¹. Parfois, comme dans le cas du D-galactose, on observe un écart appréciable, et même, avec le D-ribose, une variation qui n'est plus du tout monotone. Ces anomalies

s'expliquent aisément par la présence de plus de deux tautomères en interconversion dans la solution. La mutarotation est catalysée par les acides et les bases, et la plus lente entre les pH 3,0 et 7,0. On l'a représentée par une fonction de $[H^+]$ et $[OH^-]$, du type $A + B [H^+] + C [OH^-]$, ce qui donne par exemple l'équation (1.6) pour le glucose à 20°C.

$$(1.6) \quad k_1 + k_2 = 0,0060 + 0,18 [H^+] + 16,000 [OH^-]$$

L'observation de la mutarotation ne permet de connaître que la somme $k_1 + k_2$. N'importe comment, k_1 et k_2 sont des constantes composites. On a de très fortes raisons de penser que l'équilibre anomérique passe par l'intermédiaire carbonylé (Fig. 1.5). Entre autres indications, l'oxygène porté par le carbone anomérique ne s'échange pas avec l'eau pendant l'opération.

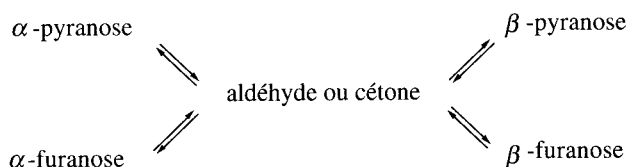
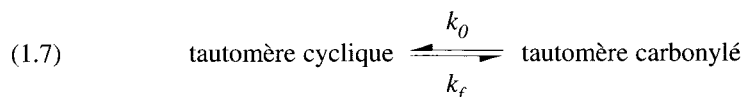


Figure 1.5 Equilibre tautomérique en solution.

Chacun des équilibres partiels de la figure 1.5, représenté par une équation du type (1.7) fait intervenir deux constantes de vitesse élémentaires, k_o et k_f correspondant respectivement à l'ouverture et à la fermeture du cycle. Leur rapport $K = k_f/k_o$ est la constante d'équilibre, mesurable sur les spectres de RMN si l'on peut observer avec assez de précision le signal du carbonyle.



On a pu mesurer k_o et k_f dans un certain nombre de cas^[6]. Lorsque les constantes de vitesse sont de l'ordre de 10-200 s⁻¹, la méthode de mesure de l'élargissement des raies sur le spectre de RMN, selon Gutowsky et Holm, est applicable. Pour les valeurs plus faibles, de 0,05 à 10 s⁻¹, on a fait appel à une autre méthode, applicable aussi bien en RMN du proton qu'en RMN de ¹³C, le transfert de saturation entre deux sites. On irradie à saturation à la fréquence du tautomère acyclique. Le bouclage de l'hémiacétal change son environnement, il devient le carbone hémiacétalique, mais ne contribue pas à l'intensité du signal de ce carbone. Expérimentalement, on observe qu'en prolongeant l'irradiation à la fréquence de résonance du carbonyle, on provoque une baisse de l'intensité de la résonance hémiacétalique. Celle-ci se stabilise à un niveau final qui dépend de la relaxation au site hémiacétalique et de la vitesse d'ouverture du cycle. Une formule permet d'en extraire la vitesse d'ouverture, et la méthode est utilisable dans

la zone $0,05 - 10 \text{ s}^{-1}$. A titre d'exemple, on a reproduit sur la figure 1.6 les variations avec le pH de k_0 pour les deux anomères **1.26** (α) et **1.27** (β) d'un métabolite très important, le D-ribose 5-phosphate, obtenu avec la molécule marquée D-[1- ^{13}C] ribose 5-phosphate. Le lecteur observera l'ordre de grandeur de k_0 . On peut d'ailleurs observer des valeurs beaucoup plus élevées avec d'autres sucres, même à pH 7,5. Quant à la constante k_p , elle est évidemment beaucoup plus élevée, puisque K est en général très supérieur à 1.

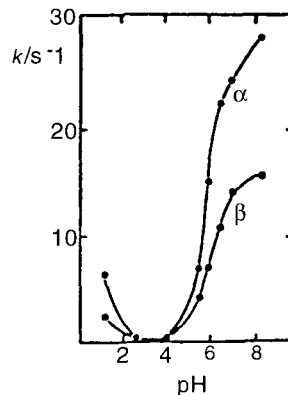
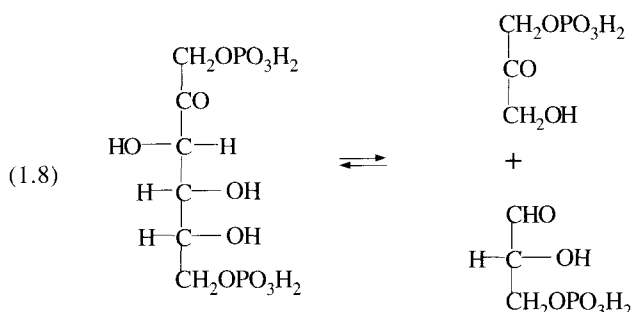


Figure 1.6 Variation en fonction du pH de la constante d'ouverture des furanoses **1.26** (α) et **1.27** (β), en solution 0.3 M dans $^2\text{H}_2\text{O}$ à 15 % à 24°C. Extrait de R. Barker et A. S. Serianni, *Acc. Chem. Res.*, 19 (1986) 307-313 (publié avec l'aimable autorisation de l'American Chemical Society ; © 1986 American Chemical Society).

1.5 CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR CES MESURES

Le lecteur peut être tenté de penser que les raffinements expérimentaux décrits dans les paragraphes précédents, qui utilisent des techniques difficiles, relèvent de préoccupations essentiellement académiques. En fait, dans le domaine de la chimie organique, nombre de réactions des sucres s'expliquent le plus facilement en admettant que le tautomère carbonylé est en équilibre rapide avec les cycles dominants. On observe des réactions typiques de carbonyle. De plus la mesure, même approximative, de la concentration en aldéhyde ou cétone, permet, par application de la relation de Gibbs, d'apprécier l'ordre de grandeur de son excès d'enthalpie libre par rapport aux formes cycliques, soit environ 6 kcal mol^{-1} pour le glucose.

Du point de vue de l'économie des cellules vivantes, la configuration anomérique des sucres libres n'est probablement pas indifférente, puisque la Nature a prévu une enzyme, la *mutarotase* (Aldose 1-épimérase), très répandue dans les tissus animaux et les bactéries, qui catalyse la mutarotation. L'enzyme de *Escherichia coli* a un maximum d'activité au voisinage de la neutralité. L'énergie d'activation $\Delta G^\ddagger = 11,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ est fortement abaissée, comme d'habitude, par rapport à celle de la réaction catalysée non enzymatiquement, voisine de 17 kcal mol^{-1} . Elle admet comme substrat le D-glucose, le D-galactose et le D-fucose, mais non le D-mannose^[9].



Le tableau 1.2 montre que la forme carbonyle, ici cétonique, est beaucoup plus importante avec le D-fructose et son diphosphate **1.21**. L'un comme l'autre, en forme acylique, présentent une fonction mixte caractéristique, la fonction carbonyle β -hydroxylé (aldol ou céto). Une des propriétés de cette fonction est sa rupture, selon une réaction réversible en présence de catalyseurs purement chimiques. La réaction du diphosphate **1.21** s'écrit selon l'équation (1.8). Elle est catalysée par l'enzyme *aldolase*, et c'est une voie majeure de création de liaisons carbone-carbone dans les cellules.

RÉFÉRENCES

- [1] G. M. Brown et H. A. Levy, *Acta Crystallogr.*, B35 (1979) 656-659.
- [2] S. S. C. Chu et G. A. Jeffrey, *Acta Crystallogr.*, B24 (1968) 830-838.
- [3] S. J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 42 (1984) 15-68 ; 49 (1991) 19-35.
- [4] K. B. Hicks, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46 (1988) 17-72.
- [5] S. Honda, S. Suzuki et K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 317-325.
- [6] R. Barker et A. S. Serianni, *Acc. Chem. Res.*, 19 (1986) 307-313.
- [7] M. J. King-Morris et A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 3501-3508.
- [8] H. S. Isbell et W. Pigman, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 23 (1968) 11-57 ; 24 (1969) 13-65.
- [9] F. Hucho et K. Wallenfels, *Eur. J. Biochem.*, 23 (1971) 489-496.

Conformation des monosaccharides et de leurs dérivés

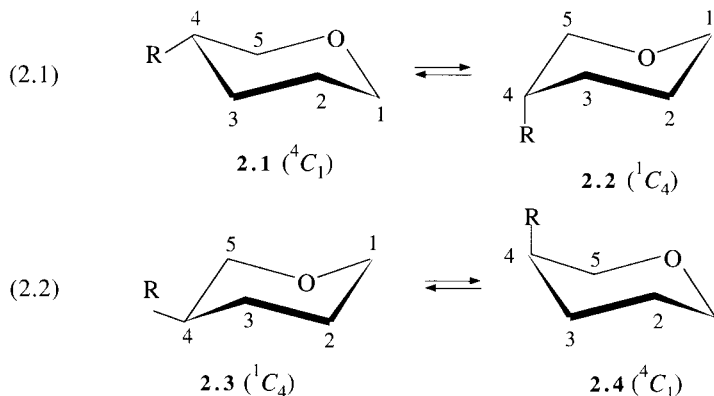
2.1 SYMBOLES DE CONFORMATION : PYRANOSSES

Les conformations remarquables du cycle oxane (tétrahydropyranne) des pyranoses sont les mêmes que celles du cyclohexane. On numérote les carbones à partir du carbone hémiacétalique, dit anomérique. Cette convention n'est pas conforme à la règle de numérotation des hétérocycles, qui attribue le numéro 1 à l'hétéroatome (ici, l'oxygène). Représentons l'oxane avec les carbones 1, 3 et 5 dans un plan horizontal, les carbones 1 et 4 dans le plan du papier censé vertical, et l'oxygène cyclique *en arrière* du plan du papier. L'observateur situé au-dessus du cycle voit les numéros défiler dans le sens des aiguilles d'une montre. Dans un pyranose, tous les carbones, ou presque tous, sont substitués, mais pour la commodité de l'exposé, il suffira d'introduire un substituant R à un site arbitraire. L'équation (2.1) représente alors l'extension à la chimie des pyranoses de l'équilibre classique de conformation du cyclohexane.

Le symbole 4C_1 de la conformation **2.1** indique que dans la représentation conventionnelle, les carbones 1 et 4 sont respectivement au-dessous et au-dessus du plan moyen de la molécule. Le symbole de la conformation **2.2** est alors 1C_4 . De même, l'énantiomère **2.3** du pyranose **2.1** donne lieu à un équilibre conformationnel (**2.2**), symétrique du précédent, auquel correspondent, selon notre convention, les symboles 1C_4 et 4C_1 .

On voit qu'on aboutit à un résultat choquant : la convention attribue le même symbole 4C_1 aux conformations **2.1** et **2.4**, ni superposables ni symétriques. Les symboles 1C_j n'ont un sens que si on connaît la série D ou L du pyranose, qu'il faut introduire pour lever l'ambiguïté. Si le sucre schématique **2.1** appartient à la série D, les symboles corrects des conformations **2.1**, **2.2**, **2.3** et **2.4** sont alors respectivement $D-{}^4C_1$, $D-{}^1C_4$, $L-{}^1C_4$ et $L-{}^4C_1$. Remarquez que l'énantiomère d'une molécule en conformation $D-{}^4C_1$ est une molécule en conformation $L-{}^1C_4$, alors que ces deux molécules se comportent identiquement dans tout environnement achiral.

Les pyranoses contenant une double liaison cyclique ou un cycle oxirane fondu, qui sont d'importants intermédiaires de synthèse, existent en conformation demi-chaise. On donnera leur description symbolique au moment de les traiter.



Enfin, il existe des conformations intermédiaires entre chaise et conformation croisée. On donnera leur description symbolique à propos de l'exemple le plus important, celui de l'acide L- iduronique (voir le paragraphe 2.8).

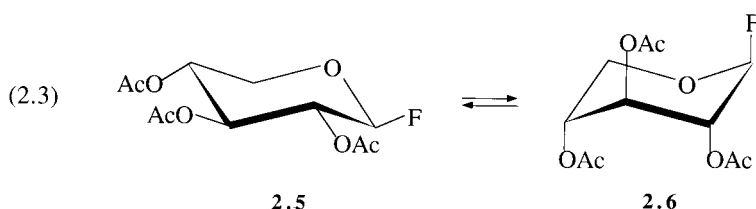
2.2 CONFORMATIONS À L'ÉTAT SOLIDE

L'élucidation de la structure d'un sucre cristallin donne évidemment à la fois sa configuration absolue et sa conformation. Les progrès techniques considérables réalisés dans la construction des diffractomètres rendent la détermination de structure par les rayons X de plus en plus rapide et de plus en plus facilement accessible au non-spécialiste. Plus rarement, on a associé au spectre de rayons X le spectre de diffraction de neutrons (spectres X, N) qui donnent les grandeurs géométriques avec plus de précision, permettent de localiser les hydrogènes et, en principe, de connaître la répartition de la densité électronique dans les couches de valence. Les méthodes par diffraction sont les plus précises des techniques actuelles : elles donnent les longueurs, les angles dièdres et les angles de valence. Toutefois, elles observent des molécules maintenues rigidement dans le réseau cristallin. On connaît un grand nombre de structures de sucres à l'état solide, qui sont désormais recensées régulièrement dans la collection périodique *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Le lecteur y trouvera un examen critique des résultats du point de vue d'un cristallographe^[1].

Toutefois, la préparation d'un cristal adéquat peut s'avérer une affaire plus difficile que la spectroscopie elle-même. Bien sûr, les sucres sont typiquement une famille « hautement cristalline ». Mais, pour ses purifications, le chimiste contemporain compte plus sur les méthodes chromatographiques, plus systématiques et plus puissantes, que sur la recherche aléatoire du solvant idéal de cristallisation. Il y a aussi un problème plus fondamental. La conformation dans le cristal peut n'être pas la même qu'en solution. Par exemple, considérons l'équilibre conformationnel (2.3) d'un dérivé fluoré et acétylé du β -D-xylopyranose :

Ce dérivé fluorure de 2,3,4-tétra-*O*-acetyl- β -D-xylopyranosyle adopte la conformation tétraéquatoriale **2.5** dans le cristal, mais en solution, il donne lieu à un équilibre conformationnel où la conformation tétraaxiale **2.6** est très fortement prédominante (80-90 %)^[2]. La conformation tétraéquatoriale **2.5** a donc un excès d'énergie sur **2.6**, que l'on peut calculer, au moyen de la relation de Gibbs, comme au moins égal à 0,8 kcal mol⁻¹. Ce léger excès est donc compensé lors de l'élaboration du cristal, qui sélectionne la conformation tétraéquatoriale en solution et déplace l'équilibre totalement vers la gauche. Peut-être la plus grande planéité de la conformation **2.5** favorise-t-elle un empilement compact.

Ceci dit, lorsque la conformation en solution d'une molécule apparaît unique en solution, avec nos méthodes actuelles d'observation, dans la vaste majorité des cas, c'est celle-ci que l'on retrouve dans le cristal.



2.3 CONFORMATION EN SOLUTION : RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU PROTON

On a déjà mentionné au chapitre premier l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire à l'étude des équilibres anomériques, par analyse de la partie du spectre relative aux protons anomériques. En général, l'analyse du spectre à 250 MHz d'un monosaccharide ne présente aucune difficulté. Le couplage vicinal entre protons axiaux est de l'ordre de 8-11 Hz, le couplage entre protons gauches de l'ordre de 1-3 Hz. Le couplage équatorial-axial est plus élevé que le couplage équatorial-équatorial, souvent nul. Lorsque la configuration d'un dérivé pyranosique est connue, on peut en général trouver un couple de protons vicinaux *trans*. Si on peut mesurer leur couplage sur le spectre, la conformation est déterminée sans ambiguïté si ce couplage est proche d'une des valeurs extrêmes données ci-dessus. Il est futile de calculer les angles dièdres avec une grande précision par les relations de Karplus, et de tels renseignements ne sont pas nécessaires pour prédire des propriétés de réactivité, par exemple.

Quelques exemples montreront les particularités visibles sur des spectres de monosaccharides reproduits sur les figures 2.1, 2.2 et 2.3. Le méthyl β -D-galactopyranoside **2.7** est représentatif du résidu galactose intérieur des chaînes de glycolipides. Le méthyl α -L-fucopyranoside **2.8**, en conformation L-¹C₄ est représentatif d'une branche de l'*épitope* (voir le chapitre 16) des antigènes des groupes sanguins principaux. L'acide sialique **2.9** en conformation D-¹C₄ joue un rôle

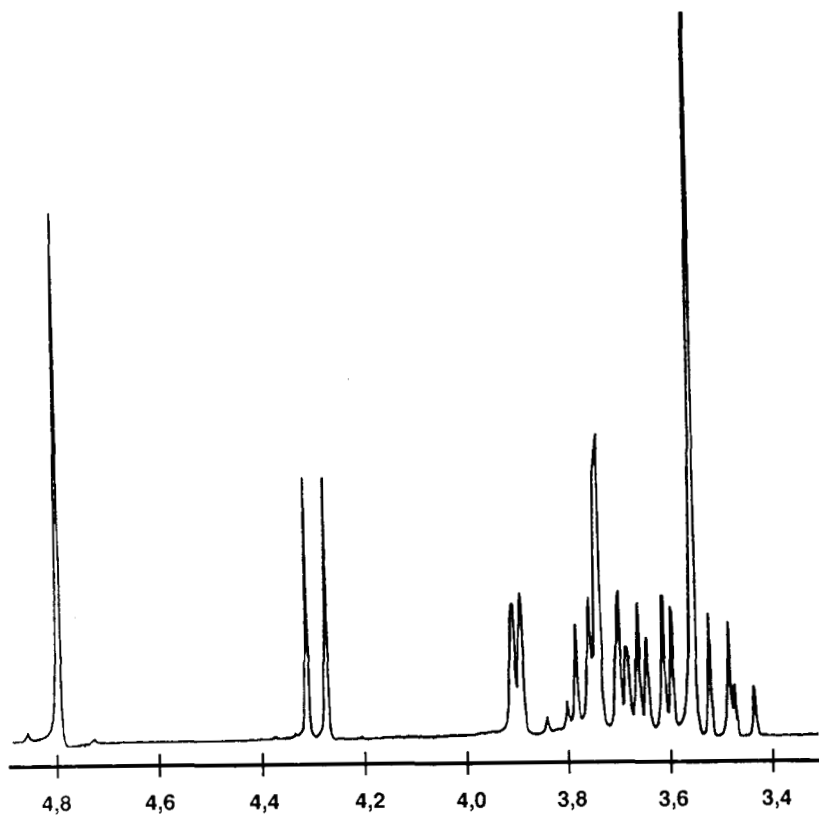
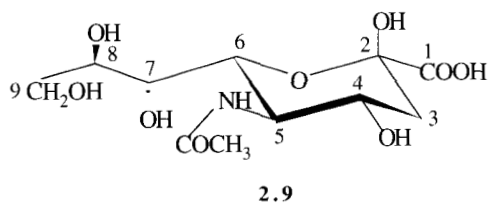
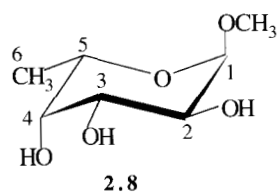
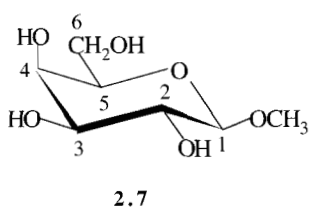


Figure 2.1 Spectre de RMN du proton à 250 MHz du méthyl β -D-galactopyranoside dans D_2O .



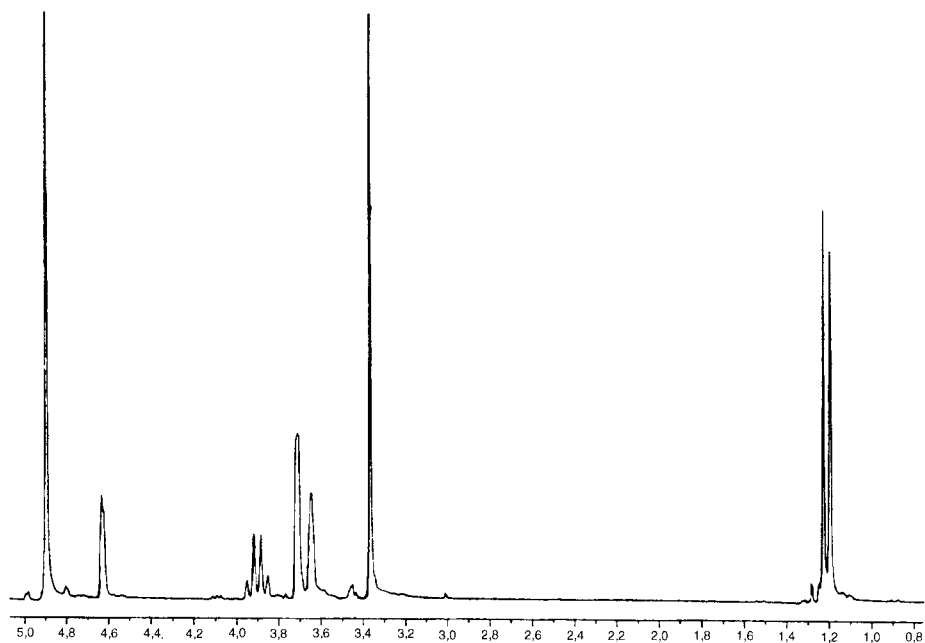


Figure 2.2 Spectre de RMN du proton à 250 MHz du méthyl α -L-fucopyranoside dans D_2O .

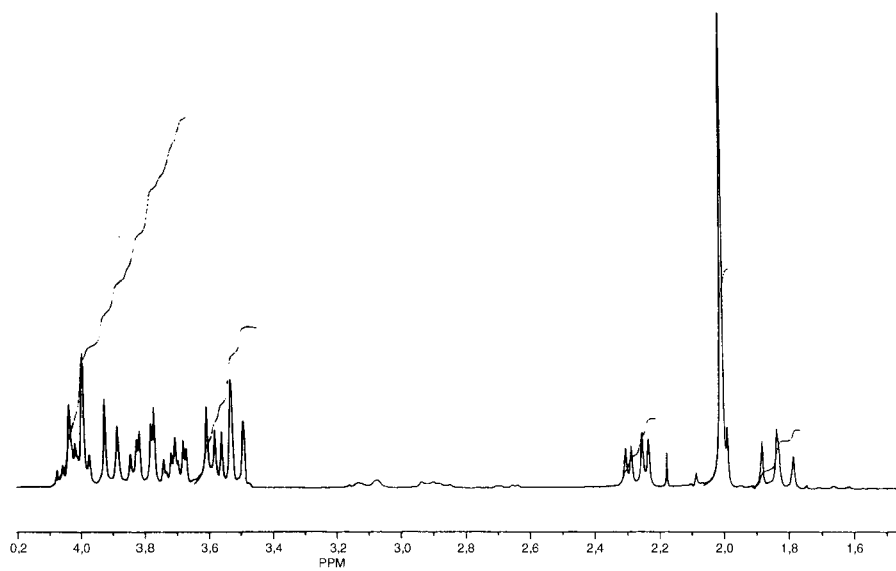


Figure 2.3 Spectre de RMN du proton à 250 MHz de l'acide *N*-acétylneuraminique.

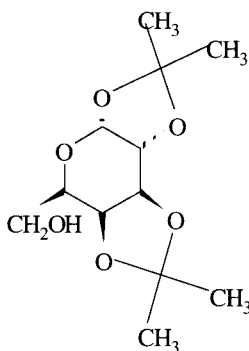
Protons	2.7 *	2.8 **	2.9 *
H-1	4,30 (8)	4,60 (1)	
H-2	3,47 (10)	3,71	
H-3ax	3,62 (3,5)	3,71	1,88 (13) (12)
H-3eq			2,32 (13) (4,5)
H-4	3,90 (1)	3,65	4,07 (10)
H-5	vers 3,75 (4,9) (7,4) ***	3,85 (6,5)	3,93 (10)
H-6	3,75 (-12) ***	1,20	4,07 (1)
H-7			3,55 (9)
H-8			3,75 (6) (2,5)
H-9			3,62 (11,5)
H-9'			3,84 (11,5)
N-acétyl			2,05
O-méthyl	3,55	3,38	

Tableau 2.1 Données de RMN pour les sucres **2.7**, **2.8**, **2.9**. Au-dessous de δ (en p.p.m à partir de Me₄Si), on donne les couplages² J , $J_{n, n+1}$, dans cet ordre, entre parenthèses.
 (* Solvant D₂O, pic HOD à 4,80 p.p.m ; ** solvant CD₃OD, pic HOD à 4,85 p.p.m ;
 *** valeurs calculées d'après D. Welti, *J. Chem. Res. (M)*, (1977) 3566-3587.)

important dans les phénomènes de reconnaissance. Les valeurs numériques des déplacements chimiques et des couplages sont regroupées dans le tableau 2.1.

Dans certains cas, on observe des valeurs intermédiaires des couplages, d'origines diverses :

a) La conformation s'éloigne notablement d'une chaise classique. C'est ce que l'on observe sur le *bis* cétal **2.10**, « diacétone-galactose » (1,2;3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose). On l'a dessiné comme un composé alicyclique ordinaire pour ne pas préjuger de sa conformation.



2.10

Dans CDCl_3 , les couplages sont $J_{1,2}$ 5,0 ; $J_{2,3}$ 2,4 ; $J_{3,4}$ 8,0 et $J_{4,5}$ 1,4 Hz. Le lecteur pourra s'assurer que ces couplages sont incompatibles avec une conformation $\text{D-}^4\text{C}_1$. On a proposé une conformation intermédiaire entre croisée et bateau^[3]. La fusion de deux cycles pentagonaux sur l'oxane est la cause de cette distorsion. Ceci est un cas extrême, on observe aussi des conformations chaises moins radicalement déformées.

b) Il y a un équilibre entre plusieurs conformations. Ce que l'on mesure est alors une moyenne pondérée. Ceci sera développé longuement au paragraphe 2.6.

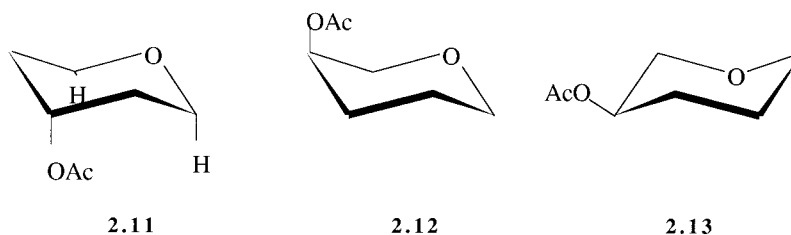
Nous n'avons parlé ici que de l'application de la RMN aux monosaccharides ; le développement de la chimie des oligosaccharides a dû faire appel à des techniques plus compliquées, qui seront esquissées au chapitre 9.

2.4 GÉNÉRALITÉS SUR LES FACTEURS DE CONFORMATION DES MONOSACCHARIDES

Comme le montre l'exemple 2.10 de la section précédente, les contraintes mécaniques introduites par la fusion de l'oxane avec d'autres cycles ont une influence prépondérante sur sa conformation. On traitera les cas analogues au fur et à mesure de leur apparition dans la suite de l'ouvrage. Dans le reste de ce chapitre, il ne s'agira que de composés monocycliques.

Dans l'équilibre des deux conformations chaises d'un cyclohexane substitué, l'excès d'enthalpie libre de la conformation la moins stable est calculé comme la différence entre deux sommes de termes, qui représentent respectivement les interactions diaxiales 1,3 et les interactions gauches 1,2 de chaque conformère. On admet donc une loi d'additivité des compressions stériques. Ce traitement semi-quantitatif perd une partie de son sens avec les pyranoses. Tous les carbones sont fonctionnels, ce qui doit faciliter la propagation des interactions d'un bout à l'autre de la molécule, et diminue la plausibilité de l'approche par addition de contributions indépendantes. De plus, avec les sucres non ramifiés, essentielle-

ment ceux auxquels nous aurons affaire, les substituants sont le plus souvent des groupements hydroxyle, acétoxy et benzoxyloxy. L'encombrement de l'hydroxyle varie suivant son degré de solvation. L'acylation diminue son volume de façon imprévisible en déplaçant de la densité électronique vers le carbonyle. Enfin, presque chaque position a, dans une certaine mesure, un statut particulier. Les anomalies sont très marquées pour la position 1 de tous les pyranoses et pour la position 5 des hexopyranoses. On les discutera longuement dans les paragraphes 2.5 et 2.6. Restent les positions 2, 3, 4. Dans le 4-acétoxyoxane **2.11**, le substituant axial subit la compression stérique traditionnelle due aux deux liaisons C – H axiales en 2 et 6. Par contre, dans le 3-acétoxyoxane **2.12** (et dans le 5-acétoxy), le substituant est opposé à un seul C – H axial, l'autre position étant occupée par l'oxygène cyclique. Le composé **2.12** donne lieu à un équilibre conformationnel où il y a presque la même quantité des conformations **2.12** et **2.13**. L'énergie conformationnelle est pratiquement nulle à cette position.

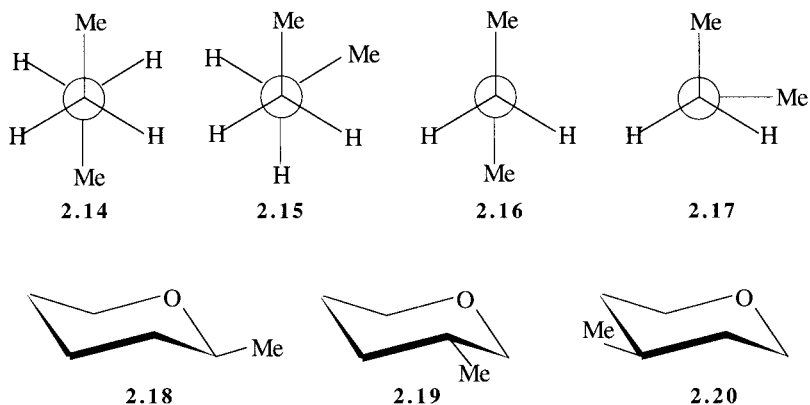


En fait, la conformation des pyranoses est dominée par deux effets qui n'existent pas dans le cyclohexane, et qui se manifestent aux positions 2 et 6 de l'oxane. L'un d'eux est particulier aux hexopyranoses et je propose de l'appeler « effet de coplanarité » pour ne pas impliquer de structure particulière restrictive dans le nom d'un effet déjà présent dans le méthoxyéthane. L'autre effet, présent dans tous les pyranoses, est l'effet anomérique : le nom de cet effet, tiré du vocabulaire des sucres parce que c'est dans cette famille qu'on l'a reconnu la première fois, en dissimule en fait le caractère très général puisqu'il est déjà présent dans le méthyl chlorométhyl-éther. Les conséquences de ces effets peuvent être modulées par des interactions de type cyclohexane, mais pas au point de nécessiter plus qu'une discussion qualitative.

2.5 EFFET DE COPLANARITÉ

Il est bien connu que le butane a deux conformations préférentielles, représentées selon une projection de Newman perpendiculaire à la liaison 2-3 par **2.14** (anti) et **2.15** (gauche).

La figure 2.4 I indique en *b* la variation d'énergie de la molécule en fonction de l'angle dièdre MeC – CMe et, en *a*, la population des conformations corres-



pondantes donnée par des calculs *ab initio*^[4]. La figure 2.4 II indique les variations correspondantes pour le méthoxyéthane^[5], pour lequel, par analogie, on prévoit deux conformations privilégiées, **2.16** et **2.17**. Ce qu'il y a d'important à reconnaître dans les courbes de la figure 2.4, c'est que l'excès d'énergie de la forme *gauche* sur la forme *anti*, qui est de 0,70 kcal mol⁻¹ dans le butane, s'élève à 1,96 kcal mol⁻¹ dans le méthoxyéthane. En conséquence, la population de cette conformation est extrêmement faible. On a ici l'exemple le plus simple possible de la stabilisation considérable de la conformation *anti* due à la présence de l'oxy-

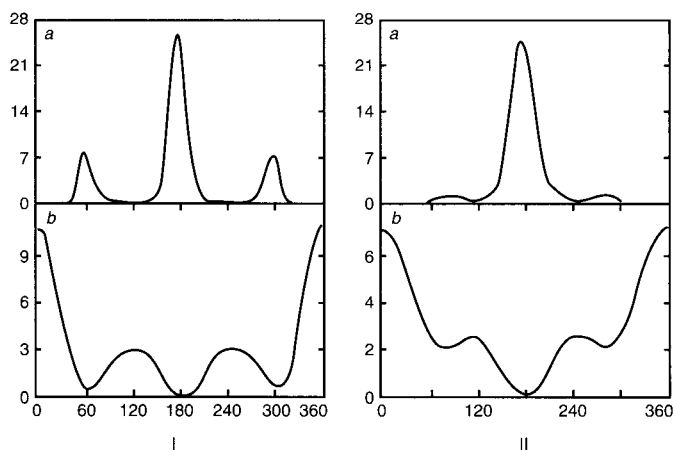


Figure 2.4 Données quantitatives théoriques sur l'équilibre conformationnel du butane (I) et du méthoxyéthane (II). Abscisses : angles dièdres MeC-CMe ou MeC-OMe ; ordonnées : a) 10³ fractions molaires par degré d'angle, b) kcal mol⁻¹. D'après W. L. Jorgensen, R. C. Binning, Jr. et B. Bigot, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 4393-4399 et W. L. Jorgensen et M. Ibrahim, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 3976-3985 (publié avec l'aimable autorisation de l'American Chemical Society).

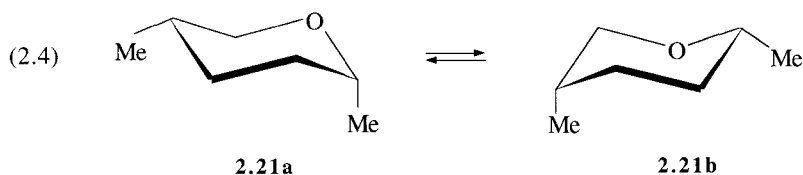
Substituant	$-\Delta G^\circ / \text{kcal mol}^{-1}$
2 - CH ₃	2,86
2 - CH ₂ OH	2,89
3 - CH ₃	$1,43 \pm 0,04$
4 - CH ₃	$1,95 \pm 0,05$

Tableau 2.2 Energies libres conformationnelles d'oxanes substitués*. (* Dans l'intervalle 163-183 K, dans des solvants chlorés). D'après E. L. Eliel, K. D. Hargrave, K. M. Pietrusiewicz et M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 3635-3643 (publié avec l'aimable autorisation de l'American Chemical Society).

gène. Le nom « effet de coplanarité » donné à ce phénomène rappelle l'exagération de la tendance de la liaison CMe à rester dans le plan C–O–C.

Passons maintenant au cas de l'oxane^[6], qui donne trois types de dérivés monométhylés, **2.18**, **2.19** et **2.20**.

Pour un oxane monosubstitué, l'excès d'enthalpie libre de la conformation à substituant axial sur la conformation à substituant équatorial est, comme on le sait, par définition, l'enthalpie libre conformationnelle (ELC) du substituant dans l'oxane, à cette position. Ces valeurs, mesurées éventuellement indirectement en utilisant des composés relais intermédiaires, sont consignées dans le tableau 2.2. Les conformations équatoriales correspondent aux conformations *anti* du butane et du méthoxyéthane et les conformations axiales (non représentées), aux conformations *gauche*. On observe que l'environnement du dérivé **2.20** est le plus voisin de celui du cyclohexane et que l'ELC est du même ordre. Par contre, la présence de l'oxygène cyclique diminue notablement l'ELC du dérivé **2.19**. Le point important est l'augmentation notable de l'ELC du composé **2.18**, où le méthyle est à proximité de l'oxygène cyclique, et possède sur un côté un environnement semblable à celui du méthoxyéthane. Considérons l'équilibre (2.4) du dérivé diméthylé **2.21**.



Ce composé adopte presque exclusivement la conformation **2.21b**. On trouve :

$$k = \frac{[\mathbf{2.21b}]}{[\mathbf{2.21a}]} = 86,0$$

correspondant à $-\Delta G^\circ = 1,62 \text{ kcal mol}^{-1}$. Si on admet que $-\Delta G^\circ$ est la différence des énergies conformationnelles des méthyles en position 2 et 4, on trouve

pour l'ELG du méthyle en 2 $1,62 + 1,43 = 3,05$ kcal mol⁻¹. La valeur du tableau 2.2, révisée à la baisse, résulte d'un calcul indirect, faisant intervenir des équilibres plus mesurables, car ici la valeur de k est très grande, et la précision sur la concentration de **2.21a** s'en ressent. On a calculé de même l'ELG d'une chaîne latérale CH₂OH en 2, disposition habituelle chez les hexopyranoses.

L'effet de coplanarité n'a pas soulevé autant d'excitation chez les théoriciens que l'effet anomérique et sa cause n'est pas connue avec certitude. L'explication la plus simple est que l'interaction 1,3-diaxiale d'un méthyle en 2 de l'oxane avec la liaison CH en 6 est augmentée, parce que ces deux substituants sont plus rapprochés que s'ils étaient séparés par -CH₂- au lieu de -O-. Le calcul pour l' α -D-glucopyranose solide avec des liaisons carbone-oxygène de 1,439 et 1,427 Å, faisant entre elles un angle de 113,7°, donne pour la distance C₁-C₅ 2,400 Å, alors que la valeur correspondante pour le cyclohexane est au moins égale à 2,5 Å. Il est connu que la compression stérique croît rapidement avec le rapprochement.

2.6 EFFET ANOMÉRIQUE

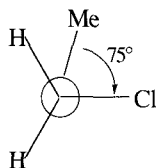
2.6.1 Données expérimentales

L'effet anomérique se manifeste à l'état pur sur une molécule très simple, le méthyl chlorométhyl éther, CH₃OCH₂Cl, représentée en projection le long de la liaison O-CH₂Cl sur la formule **2.22**.

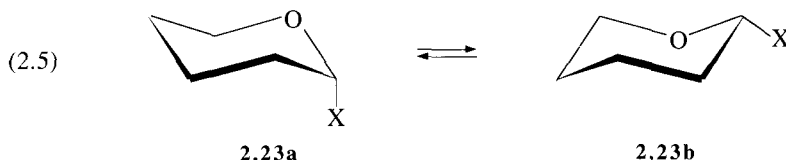
La conformation connue est celle de la molécule à l'état gazeux, donc isolée, déterminée par diffraction électronique^[7]. Au lieu d'adopter la position *anti* favorisée dans le butane, la liaison carbone-chlore construit avec la liaison OMe un dièdre de 75°. Elle est presque coplanaire à l'axe de l'orbitale de la paire libre 2p de l'oxygène, l'écart (15° en projection) étant probablement dû à une interaction non liée entre méthyle et hydrogène. La liaison carbone-chlore (1,813 Å) est plus longue que dans les chloroalkanes, la liaison O-CH₂Cl (1,368 Å) est plus courte que dans les éthers aliphatiques et que la liaison CH₃-O (1,414 Å). Enfin, on observe sur le méthyl chlorométhyl éther à l'état solide une fréquence de résonance quadripolaire de ³⁵Cl exceptionnellement basse (29,817 MHz) comparée à celle du 1-chloropropane (32,968 MHz), ce qui indique une augmentation de la population orbitale 3p dans la direction de la liaison ou, en termes moins précis, une augmentation de l'ionicté du chlore.

On retrouve le même effet conformationnel dans les 2-halogénooxanes (**2.23**, X = Cl, Br, I). Ces composés n'existent que sous la conformation à halogène axial **2.23a** qui correspond à la conformation gauche du méthyl chlorométhyl éther, dont ils sont les analogues cycliques, compte tenu des contraintes exercées par le cycle, selon l'équation (2.5).

Nous avons été habitués jusqu'à présent à l'idée qu'un substituant volumineux impose à un cycle à six éléments la conformation où il est équatorial. La tendance est donc opposée en α d'un oxygène éthéré. On observe le phénomène avec les



2.22



dérivés de sucres présentant un halogène ou, ce qui est le cas général, un atome d'oxygène sur C(1). On essaye d'évaluer l'effet anomérique à partir d'un équilibre tel que (2.5) relatif, cette fois, à un pyranose le plus général.

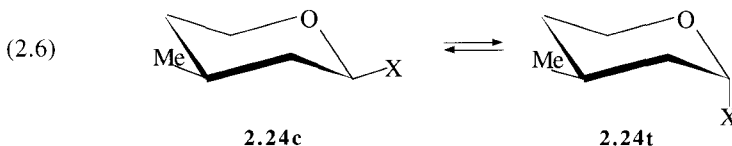
Si A_x est l'énergie libre conformationnelle de X, on pose :

$$\text{Effet anomérique} = \Delta G_x^0 + A_x$$

Malheureusement, A_x à la position 2 d'un oxane n'est pas mesurable pour un substituant à effet anomérique, car on ne peut dissocier expérimentalement la répulsion stérique de l'effet anomérique. On prend l'ELC dans le cyclohexane. L'exemple du méthyle, dépourvu d'effet anomérique (voir le paragraphe 2.5) fait supposer que la répulsion est plus grande à cette position. On obtient des valeurs par défaut. Il y a d'autres définitions, aucune n'échappe à la critique.

L'effet anomérique des halogènes est trop puissant pour qu'on puisse observer une autre conformation que **2.23a** sur les 2-halogénooxanes. L'estimation ne repose pas sur un équilibre conformationnel, mais sur une réaction chimique équilibrée (2.6) d'inversion de configuration sur C(1) des *cis* (**2.24 c**) et *trans* (**2.24 t**) 2-halo-4-méthyloxanes, catalysée par HCl^[8].

On observe toujours un mélange 97:3 où prédomine le dérivé *trans*, **2.24 t** (X = Cl), à chlore axial ($-\Delta G^\circ = 2,15 \text{ kcal mol}^{-1}$). L'expression numérique de l'effet anomérique s'obtient en ajoutant l'ELC du chlore ($0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$), ce qui donne finalement $2,65 \text{ kcal mol}^{-1}$ pour le liquide pur. De même, on a estimé la valeur de l'effet anomérique à partir d'équilibres de glycosidation^[9]. Quelques



Substituant	kcal mol ⁻¹
Hydroxy	0,9 – 1,35
Methoxy	1,3
Acetoxy	1,4
Fluor	?
Chlore	2,7
Brome	3,2
Iode	3,1
Nitro*	3,4

Tableau 2.3 Evaluation numérique de l'effet anomérique. (D'après B. Aebischer, R. Hollenstein et A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 66 (1983) 1748-1754.)

résultats^[10, 11] sont rassemblés dans le tableau 2.3. L'ordre donné par ces chiffres a sans doute une véritable signification.

2.6.2 Origine de l'effet anomérique

On observe sur les composés du chlore, du brome et de l'iode, une ou plusieurs raies d'absorption dans le domaine hertzien dont la fréquence est caractéristique de l'état de liaison de l'halogène. Cela vient du fait que les noyaux des atomes, ³⁵Cl par exemple, possèdent un moment quadripolaire qui peut exister sous plusieurs niveaux d'énergie dans un gradient de champs électrique. La relation de Townes et Dailey relie directement cette fréquence de résonance aux paramètres de description de la liaison par les orbitales moléculaires, la population *a* de l'orbitale *p_z* de l'halogène impliquée dans la liaison carbone-halogène et la moyenne *b* des populations des orbitales *p_x* et *p_y* perpendiculaires, approximée ici par 2. Pour le noyau ³⁵Cl, cette relation s'écrit :

$$\nu / \text{MHz} = 55 (2 - a)$$

La fréquence de résonance est d'autant plus basse que la population *3p_z* dans la direction de la liaison est plus grande et s'annule pour un composé ionique (*a* = 2). Dans un langage plus flou, plus la liaison est ionique, plus basse est la résonance.

On a interprété la résonance exceptionnellement basse du méthyl chlorométhyl éther comme une conséquence de la délocalisation de l'orbitale *2p_z* de la paire libre à haute énergie de l'oxygène dans l'orbitale antiliante σ_{CCl}^* de la liaison carbone-chlore^[12] (Fig. 2.5).

Ceci implique un quasi-parallélisme entre les axes de ces deux orbitales. On observe un angle $\theta = 15^\circ$, $\cos \theta = 0,97$. Dans la conformation *anti*, les deux orbitales seraient orthogonales et leur interaction nulle. L'introduction d'électrons

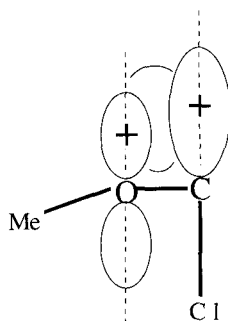
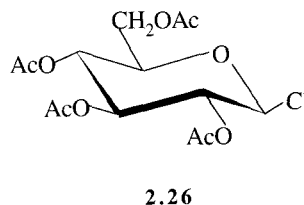
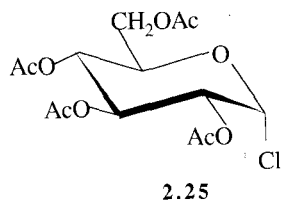


Figure 2.5 Délocalisation orbitale dans le méthyl chlorométhyl éther.

fournis par l'oxygène dans cette orbitale augmente la population $3p_z$ et abaisse donc la fréquence de résonance, mais comme il s'agit d'électrons antiliants la liaison carbone-chlore est affaiblie et s'allonge. Par contre, la liaison carbone-oxygène, à laquelle participent deux orbitales p d'axes parallèles, prend un certain caractère π , ce qui la raccourcit. L'hypothèse de la délocalisation explique de façon satisfaisante toutes les particularités du méthyl chlorométhyl éther.

Les études ultérieures sont plus directement liées aux sucres pyranosiques. On connaît une famille importante de dérivés, les halogénures de pyranosyle, où les hydroxyles alcooliques sont acylés (généralement acétylés) et l'hydroxyle hémicétalique remplacé par du fluor, du chlore ou du brome, dont les formules **2.25** et **2.26** donnent les prototypes, en série *D-gluco*.

A partir de pentoses et d'hexoses de configurations variées, on peut préparer deux collections de chlorures de pyranosyle, à chlore axial ou équatorial, respectivement analogues de **2.25** et **2.26**. Comme avec le 2-chlorooxane, l'orientation axiale du chlore selon **2.25** correspond à la conformation stable du méthyl chlorométhyl éther. La comparaison des données géométriques à l'état solide, lorsqu'elles sont disponibles, montre que la liaison carbone-chlore axiale est invariablement plus longue que la liaison carbone-chlore équatoriale. Enfin la figure 2.6 montre que, du point de vue de la résonance quadripolaire, ces composés se répartissent en deux groupes.



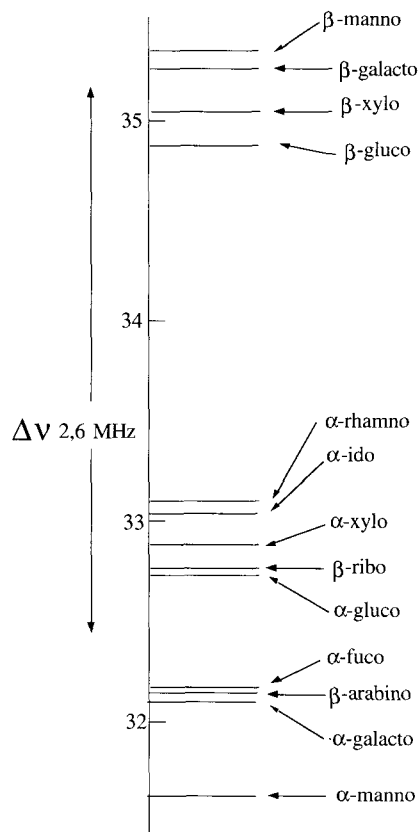


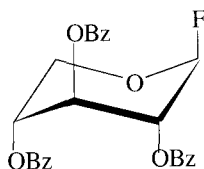
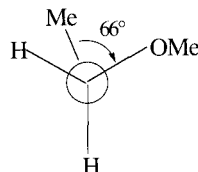
Figure 2.6 Fréquence de résonance quadrupolaire de chlorures d'hexopyranosyle péricétylés, ayant les configurations indiquées.

La fréquence de résonance du chlore axial est invariablement plus basse que celle du chlore équatorial^[13]. La figure 2.6 est aussi suggestive à un autre point de vue : la dispersion des résonances équatoriales, voisine de 0,5 Hz, est de l'ordre de grandeur de ce que les spécialistes appellent les « effets de cristal », d'origine intermoléculaire. En première analyse, on ne doit pas la considérer comme significative. Par contre, la plage de variation des résonances axiales, 1,7 MHz, est très supérieure aux effets de cristal. Cette dispersion traduit le fait, mentionné ci-dessus que l'effet anomérique du chlore (comme d'un autre substituant) dans un pyranose n'est pas indépendant de la configuration du reste de la molécule. Ainsi la résonance du chlorure axial D-manno est de beaucoup la plus basse et il est bien connu que l'effet anomérique est renforcé dans les dérivés α-D-manno.

La théorie explique aussi l'augmentation de l'effet dans le sens chlore, brome, iode ; l'orbitale σ^* est de plus en plus diffuse et se prête à un recouvrement de plus en plus efficace avec l'orbitale $2p_z$ de l'oxygène. Les polarisabilités atomiques des halogènes sont : fluor, 0,557 ; chlore, 2,18 ; brome, 3,05 ; iode, 4,7. L'effet anomérique du fluor devrait être le plus petit, en raison du caractère contracté de ses

orbitales. Il n'a pas été mesuré mais il est incontestable. Il impose 85 % de conformation tétraaxiale au dérivé **2.6** en solution. La comparaison des structures solides **2.5** et **2.27** est suggestive. La longueur de la liaison C-F axiale est 1,386 Å, celle de la liaison C-F équatoriale, 1,367 Å. Les longueurs des liaisons C(1)-O sont respectivement de 1,406 Å et 1,339 Å dans les dérivés **2.5** et **2.27**. Un calcul^[14] conduit à un effet anomérique de 1,85 kcal mol⁻¹, effectivement inférieur à celui du chlore.

Pour les sucres substitués par de l'oxygène sur C(1), la délocalisation est plus difficile à prouver, puisqu'on ne peut pas faire de spectre de résonance quadripolaire. La polarisabilité atomique de l'oxygène, 0,802, le classe entre le fluor et le chlore, aussi semble-t-il peu probable que son effet anomérique relève d'un mécanisme radicalement différent. Le diméthoxyméthane, MeOCH₂OMe, a en phase gazeuse^[15] une conformation gauche **2.28** (projection le long de CH₂-O) qui correspond à celle des méthyl α -hexopyranosides, où le groupement méthoxy est axial. Toutefois, il faut remarquer que les deux oxygènes jouent le même rôle. La délocalisation peut se produire dans les deux directions avec une géométrie adéquate. On y a vu l'origine de l'effet exo-anomérique. Comme cet effet est principalement intéressant en chimie des oligosaccharides, il sera traité au chapitre 9.

**2.27****2.28**

Notons seulement qu'il stabilise les anomères équatoriaux, donc diminue l'effet anomérique des substituants oxygénés. Cependant il y a d'autres indications physiques de délocalisation préférentielle de l'oxygène cyclique vers l'oxygène exocyclique, fournies par la mesure de la constante de couplage direct $^1J_{CH}$ entre le carbone anomère et l'hydrogène. La comparaison des valeurs $^1J_{CH}$, mesurées sur une vingtaine de couples d'anomères de configuration et de substitution variées, montre que l'on observe pour chaque couple :

$$J_{eq} - J_{ax} \approx 10 \text{ Hz}$$

Or $^1J_{CH}$, mesuré par spectroscopie de RMN de ^{13}C , est relié au pourcentage de caractère *s* de la liaison, soit ρ , par la relation

$$^1J_{CH} = 500 \rho$$

Donc le proton équatorial, présent dans l'anomère à oxygène axial, a un caractère *s* plus élevé que le proton axial, ce qui est conforme à l'idée que la liaison C-O cyclique est plus voisine d'une double liaison dans l'anomère axial que dans l'anomère équatorial (Fig. 2.5).

La délocalisation de l'orbitale $2p_z$ de l'oxygène dans l'antiliante axiale C–X est incontestable, mais ceci ne résoud pas pour autant la question de la « cause » de l'effet anomérique. Un des dogmes des théories électroniques qualitatives a été que la délocalisation est stabilisante, mais des contestations commencent à se faire jour chez les théoriciens, même concernant le traditionnel benzène. Une autre objection est que ces stabilisations se calculent à partir de configurations non délocalisées qui sont des monstres conceptuels. L'étude théorique a été faite ici dans le cadre de la théorie des orbitales moléculaires, pour **2.23a** et **2.23b** (X = Cl). Sur la figure 2.7, l'oxygène cyclique est à l'origine des coordonnées, les orbitales p et sp^2 des paires sont dirigées respectivement suivant OZ et OY. Les liaisons C(5)–O–C(1) sont dans le plan XOY, la liaison C – Cl fait un angle de 30° avec OZ.

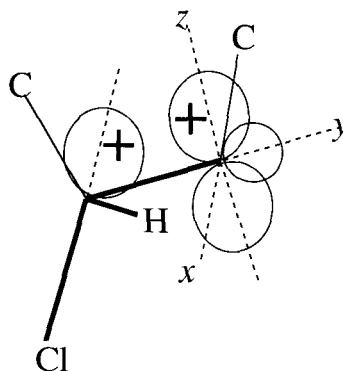


Figure 2.7 Orbitales moléculaires du 2-chloro-oxane impliquées dans la théorie de l'effet anomérique.

La stabilisation d'une orbitale moléculaire pleine d'énergie E_0 par interaction avec une orbitale vide d'énergie E_1 est donnée par la formule classique :

$$\Delta E \approx \frac{2 \beta C_0 C_1}{E_0 - E_1}$$

β dépend des conditions géométriques de l'interaction et C_0 et C_1 sont les coefficients des orbitales atomiques au contact dans l'expression des orbitales moléculaires en interaction. Cette expression n'a de sens que si on peut attribuer des énergies à ces deux orbitales moléculaires, donc s'il s'agit d'orbitales canoniques.

Lorsqu'on étudie la liste des orbitales moléculaires des 2-chloro-oxanes en conformation avec le chlore axial (Fig. 2.7) et avec le chlore équatorial, obtenues au niveau STO-3G, on observe évidemment l'interaction entre $2p_z$ de l'oxygène et σ_{CCl}^* sur le conformère axial, mais aussi d'autres interactions qui, pour être nettement plus faibles, ne sont pas négligeables : $2p_z / \sigma_{\text{CH}}^*$, dans le conformère équatorial, et les interactions entre la paire sp^2 de l'oxygène (sur O_y) et les substituants équatoriaux dans les deux conformations. La figure 2.8 donne ces interactions pour le conformère à chlore axial.

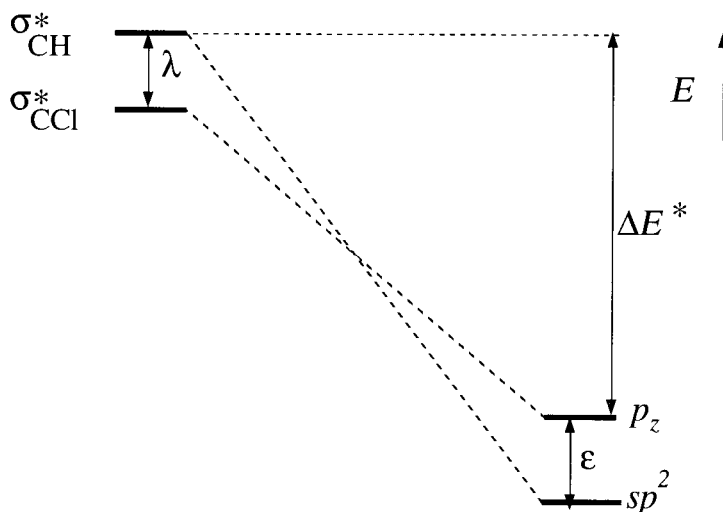


Figure 2.8 Niveaux d'énergie et interactions dans le 2-chlorooxane à chlore axial.

L'interaction $\sigma_{\text{CCl}}^* / p_z(\text{O})$ domine parce que ce sont les deux orbitales les plus proches en énergie. Le calcul complet donne pour l'effet anomérique du chlore :

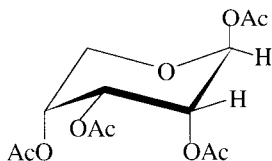
$$\Delta E = \frac{4h^*{}^2\lambda\epsilon}{(\Delta E^*)^3}$$

h^* étant calculable sur un modèle. Cette formule, qui conduit à un résultat raisonnable, 3,3 kcal mol⁻¹, a aussi le mérite de souligner que l'effet anomérique n'est observable que parce qu'il y a une différence d'énergie ϵ entre les deux paires libres de l'oxygène.

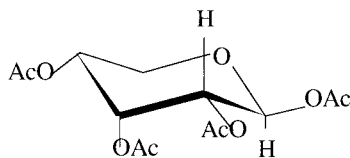
2.7 CONFORMATION DES PENTOPYRANOSSES

En raison de l'absence de chaîne latérale en C(5), il y a fréquemment mobilité conformationnelle. Le spectre de RMN du proton peut donner l'illusion d'un composé à conformation homogène, alors qu'en fait, ce que l'on observe est une moyenne temporelle, parce que l'interconversion est rapide à l'échelle de temps de la RMN. Alternativement, le spectre du conformère minoritaire peut être présent, mais échapper à la détection.

Ainsi la valeur intermédiaire du couplage $J_{1,2}$ (4,8 Hz dans l'acétone deutérée) du tétra-*O*-acétyl- β -D-ribopyranose suggère qu'il y a un équilibre entre les conformations **2.29** et **2.30**, 1C_4 et 4C_1 . Au refroidissement, le signal examiné sous 200 MHz s'élargit brusquement vers -60°C, puis se résout en deux signaux : un singulet étroit à champ plus faible, caractéristique d'un proton H-1 équatorial, et



2.29



2.30

un doublet large, à champ plus fort, caractéristique d'un proton H-1 axial. A basse température, l'équilibre correspond à un excès (2:1) de la forme triaxiale. La mesure de la température de coalescence permet de calculer la constante de vitesse pour l'inversion : elle est voisine de 117 s^{-1} à -60°C , et correspond à une énergie d'activation $\Delta G^\ddagger = 10,3 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ dans le sens ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$. Pour la réaction en sens inverse, les chiffres correspondant sont 57 s^{-1} et $10,6 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivement. Ces valeurs sont voisines de celles qu'on observe sur le cyclohexane ou l'oxane. Il est remarquable que la substitution ne cause pas de gêne à l'inversion.

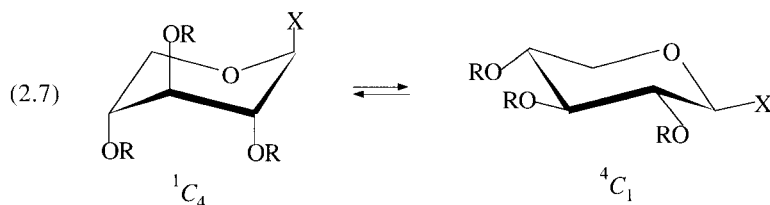
Cette expérience permet de mesurer les valeurs « exactes » des constantes de couplages $J_{1,2}$ pour les deux conformations. Si, à une autre température, les fractions molaires des conformères sont N_e et N_a , une règle de mélange donne :

$$J_{obs} = N_e J_e + N_a J_a$$

La mesure de J permet de calculer $k = N_a / N_e$ et la différence d'enthalpie, $\Delta G^\circ = -RT \ln k$. Ainsi on trouve qu'à température ambiante, il y a 55 % de conformère 2.29.

Ce gel conformationnel est exceptionnel. Le seul autre exemple parmi les pentopyranoses tétraacétylés est le dérivé β -D-lyxo. Le calcul des constantes d'équilibre à partir des spectres moyens nécessite certaines extrapolations. On n'observe pas d'effet régulier de la nature et de la polarité du solvant. On va maintenant examiner les différents types de dérivés.

Le cas le plus simple est celui des halogénures *per*-acétylés. La conformation est dominée par l'effet anomérique puissant d'un halogène et on n'observe que des conformations à halogène axial, sauf avec la configuration β -D-xylo, qui donne lieu à un équilibre (Equilibre (2.7) ; Tableau 2.4). Néanmoins, ce tableau montre que les conformations tétraaxiales sont toujours dominantes et parfois presque exclusives.



R*	X*	$k = {}^4C_1/{}^1C_4$
Ac	Cl	0,26
Bz	Cl	0,19
Ac	F	0,17
Bz	F	0,05
Ac	OAc	2,60
Bz	OBz	0,98

Tableau 2.4 Equilibre conformationnel des dérivés β -D-xylo dans CD_3COCD_3 . (* Voir l'équation (2.7)).

Si on remplace maintenant l'halogène anomérique par un acétoxy, la position d'équilibre est renversée, l'effet anomérique faible n'étant pas capable, à la température ambiante, de compenser deux interactions diaxiales. Cependant, le dérivé per-*O*-benzoylé donne lieu à un équilibre 1:1. On reconnaît ici les limites de ces analyses qui ne prennent en compte que la partie oxane. Avec les substituants benzoate, « l'essentiel » est sans doute ailleurs. Un autre aspect du problème est que les différences d'énergie conformationnelles peuvent apparaître faibles par comparaison avec les forces d'empilement dans les cristaux. Dans le cristal, le chorure β -D-xylo per-*O*-acétylé adopte la conformation tout équatoriale. De même le fluorure peracétylé, 85 % tétraaxial en solution, cristallise sous la forme tétraéquatoriale. Dans ces cas, où il y a un équilibre en solution, correspondant à des différences d'enthalpie libre voisines de $0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, il n'est pas surprenant que les forces d'empilement – la tendance à la structure compacte – puisse dominer. Plus étonnant est le cas du fluorure per-*O*-benzoylé, qui cristallise sous la forme tétraaxiale. Là, il semble probable que l'empilement des noyaux phényle soit un facteur essentiel.

En résumé, ces dérivés per-acylés conduisent à des équilibres conformationnels, sauf dans des cas dont l'issue est particulièrement évidente (configuration α -D-xylo, 4C_1 , β -D-arabino, 1C_4). Restent les pentoses libres en solution aqueuse. Les interactions diaxiales sont plus élevées qu'avec les acétates et l'effet anomérique plus faible. Sur les huit configurations des D-pentoses, quatre (β -D-arabinose, α -D-lyxose, α -D-ribose et β -D-ribose) donnent lieu à un équilibre conformationnel.

2.8 CONFORMATION DES HEXOPYRANOSSES ET DE LEURS DÉRIVÉS

La tendance de la chaîne latérale à adopter la position équatoriale pèse d'un poids très lourd^[16] ; il n'existe qu'un seul cas démontré où cette chaîne adopte la position axiale, c'est celui du méthyl 2,4-bis(*N*-acétyl-*N*-benzoylamino)-3-6-di-*O*-benzoyl-2,4-didéoxy- α -D-idopyranoside, composé exotique, avec deux sub-

stituants de volume énorme. Nous avons souligné dans la section précédente que les règles applicables aux dérivés simples des cycles à six éléments n'ont aucune raison d'être généralisables à ces cas extrêmes.

D'une façon plus générale, on peut prévoir quatre orientations autour de l'oxygène cyclique d'un D-pyranose : I et III pour les dérivés *trans*, II et IV pour les *cis* (Fig. 2.9). A l'exception de l'idose (et peut-être de l'altrose), tous les dérivés *trans*, ici les α -D-hexopyranoses monocycliques et leurs dérivés, existent sous la seule conformation observable D^4C_1 , qui correspond à la conformation locale I, doublement stabilisée par l'effet anomérique et l'effet de coplanarité.

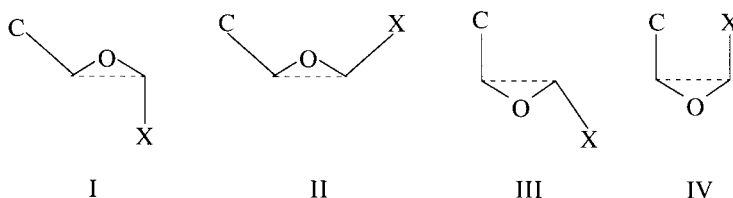
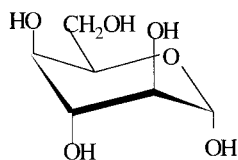


Figure 2.9 Orientations possibles des substituants autour de l'oxygène cyclique d'un pyranose.

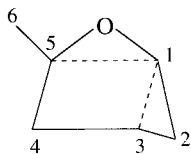
L' α -D-idopyranose, **2.31**, est le seul pyranose présentant deux interactions 1,3-diaxiales en conformation D^4C_1 . C'est ici le moment d'introduire de nouvelles conformations et leurs symboles. La conformation croisée (*skew*, *S*), **2.32**, est décrite en prenant comme plan de référence celui des quatre atomes coplanaires (non consécutifs). On complète le symbole en indiquant les numéros des atomes situés au-dessus et au-dessous du plan de référence et, naturellement, le symbole de la série, ce qui donne ici D^0S_2 . L' α -D-idopyranose en conformation D^0S_2 , **2.33**, ne présente plus d'interactions diaxiales prohibitives, et satisfait néanmoins aux critères de stabilisation locale autour de l'oxygène cyclique, au moins partiellement. Le spectre de RMN du proton de l' α -D-idopyranose en solution aqueuse est celui d'un mélange en équilibre des conformations **2.31** et **2.33**.

La configuration *ido* est présente, de façon isolée au milieu d'autres résidus monosaccharides dans les chaînes polycondensées, dites « glycosaminoglycanes », de polysaccharides naturels : le dermatane sulfate, l'héparane sulfate et l'héparine. Le dérivé en question, qui appartient à la série L, est l'acide 2-O-sulfo-L-iduronique. On l'a représenté en **2.34** ($R = R' = H$) de façon non conformationnelle, avec la configuration α -L-*idopyrano* présente dans ces polysaccharides. Le résidu L-*ido* est isolé dans la séquence, au milieu des chaînes attachées respectivement sur O(1) et O(4) (paragraphe 17.3). Il se trouve à l'état de mélange des conformations L^1C_4 **2.35** et L^2S_O **2.36**. La proportion de forme croisée varie de 40 à 64 % selon les séquences oligosaccharidiques attachées R et R'^[17].

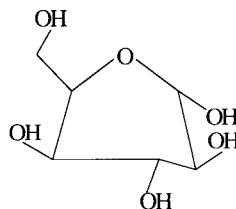
L'ancrage vigoureux de presque tous les hexopyranoses en conformation D^4C_1 (L^1C_4) par effet de coplanarité entraîne une certaine rigidité des chaînes



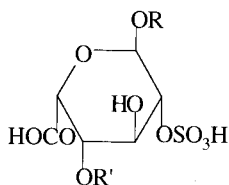
2.31



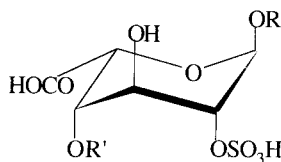
2.32



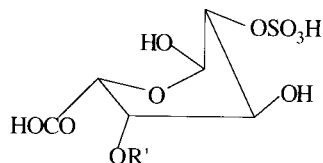
2.33



2.34



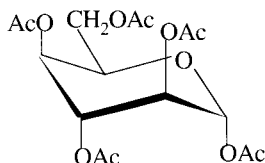
2.35



2.36

oligosaccharidiques. Il est possible que l'introduction de résidus *ido* à conformation flexible en certains sites crée la souplesse indispensable à certaines fonctions.

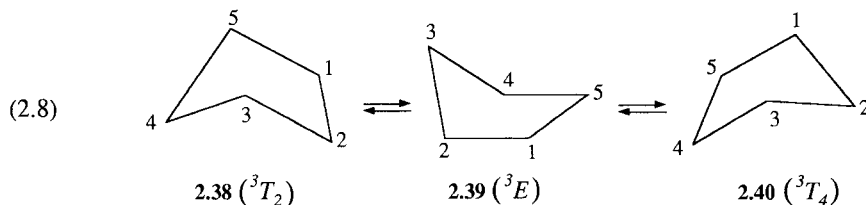
Dans l' α -D-idopyranose peracétylé, la compression stérique des oxygènes axiaux est diminuée par l'acétylation, et l'effet anomérique est augmenté. Cet ester existe exclusivement en conformation D- 4C_1 tétraaxiale **2.37**^[10].



2.37

2.9 FURANOSES

L'oxolane est aussi flexible que le cyclopentane, sur lequel on raisonnera d'abord. Il est commode de mettre des noms sur certaines conformations, par exemple conformation croisée (twist) 3T_2 **2.38**, enveloppe 3E **2.39**, croisée 3T_4 **2.40**, dont les symboles sont calqués sur ceux du cyclohexane (Equilibre (2.8)).



Ce ne sont que des repères géométriques. Les conformations **2.38**, **2.39** et **2.40** sont trois étapes d'une déformation continue qui ne sont pas séparées par des barrières appréciables. On peut construire une succession de conformations *E* et *T* alternées qui nous ramène de façon continue à la case départ. Par exemple, partant d'une enveloppe 3E , on passera par les enveloppes 5E , 2E , 4E , 1E pour revenir à 3E : du point de vue de sa *forme* géométrique, chaque enveloppe se déduit de la précédente par rotation de 144° , mais ce n'est pas la molécule qui tourne, seulement sa forme. On appelle ceci pseudo-rotation.

Dans une conformation gelée du cyclopentane, il y a 5 angles dièdres, $\theta_0 \dots \theta_4$, qui sont fixes (Fig. 2.10 *a*). Au cours de la pseudo-rotation, l'un d'eux, soit θ_0 , varie entre deux valeurs extrêmes, ϕ_0 et $-\phi_0$, par exemple, en passant par les valeurs θ_0 , ϕ_0 , 0, $-\phi_0$, 0, θ_0 . D'où l'idée d'approximer cette fonction périodique par une série de Fourier réduite à un seul terme, en écrivant $\theta_0 = \theta_m \cos P$. L'angle *P* varie de 360° lorsque la molécule subit le circuit complet de pseudo-rotation. (Notez qu'alors, une conformation particulière a fait deux fois le tour de la molécule, $2 \times 360^\circ$.)

L'angle dièdre θ_0 a sa valeur maximum dans la conformation 3T_2 . On a alors $\theta_0 = \theta_m$, donc $P = 0^\circ$. Pour les étapes suivantes 3E , 3T_4 de la pseudo-rotation, on a $P = 18^\circ$ et 36° . De même l'itinéraire ${}^2T_1 \rightarrow {}^2E \rightarrow {}^2T_3$ correspond à $P = 144^\circ$, 162° , 180° . Dans la conformation 2T_3 , le dièdre est de sens opposé à celui de la conformation 3T_2 , et l'on a $\theta_0 = \theta_m \cos(180^\circ) = -\theta_m$. Il existe bien sur une valeur de *P* pour chacune des conformations repère, mais la nouveauté apportée par l'introduction du paramètre *continu* *P* est la possibilité de caractériser les conformations intermédiaires entre *T* et *E*, qui sont celles que l'on rencontre réellement.

A partir de θ_m et *P* on calcule les autres angles dièdres par la formule :

$$\theta_j = \theta_m \cos(P + j\delta) \quad j = 0, 1 \dots 4 \quad \delta = 144^\circ$$

On étend ces considérations aux furanoses en remplaçant le sommet 5 par l'oxygène (Fig. 2.10 *b*). Les angles dièdres sont notés τ_0 , $\tau_1 \dots \tau_4$. En dépit de la flexibilité du système furanosique, il y a une conformation (ou deux) à plus basse énergie, déterminée par l'emplacement et l'orientation des substituants et, en phase solide, par les forces d'empilement dans le cristal. En général, elle ne coïncide pas avec une des conformations *E* ou *T*. Altona et Sundaralingam^[18] propo-

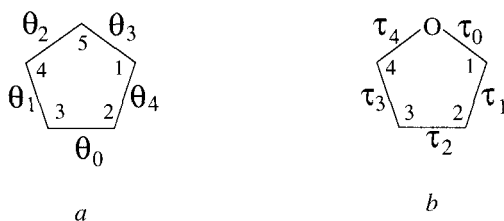
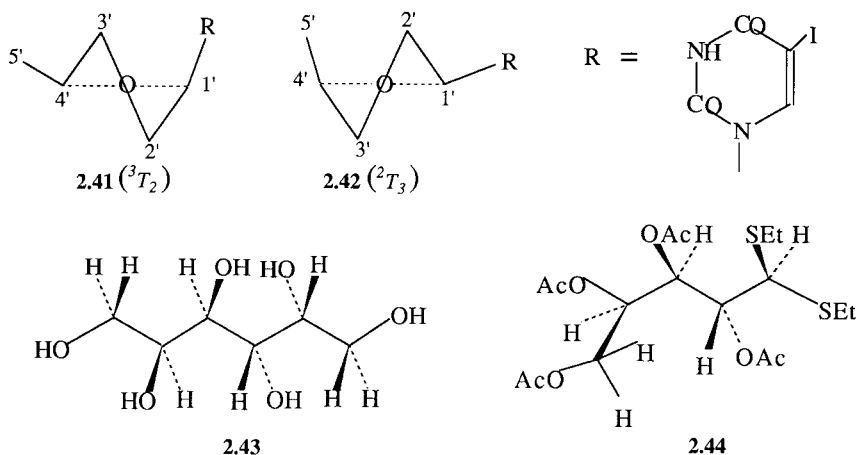


Figure 2.10 Convention de représentation des angles dièdres du cyclopentane (*a*) et de l'oxolane (*b*).



sent de la décrire avec les paramètres θ_m et P . Cette description s'est imposée dans la littérature cristallographique^[1].

On expliquera cette notation sur un exemple tiré de la chimie des nucléosides-nucléotides. C'est de très loin la famille la plus importante de furanosides (voir le paragraphe 3.4). Les nucléosides sont des combinaisons glycosidiques d'une base hétérocyclique et d'un résidu β -D-ribofuranosyle ou 2-déoxy- β -D-érythro-pentofuranosyle. L'exemple choisi est le nucléoside artificiel 5-iodouridine. On observe deux conformations différentes de cette molécule dans le même cristal, voisines respectivement de 3T_2 **2.41** et 2T_3 **2.42**. L'angle dièdre maximum est entre 2' et 3'. Pour que P soit voisin de 0, on choisira donc $\tau_2 = \theta_0$ (Fig. 2.10) et, par suite, pour $\theta_1 \dots \theta_4$, les valeurs τ_3 , τ_4 , τ_0 , τ_1 , respectivement. La connaissance de deux angles dièdres permet de calculer τ_m et P . L'angle P a le caractère d'une phase et τ_m est une mesure de l'aplatissement du cycle. La conformation **2.41**, $P = 9^\circ$, est à mi-chemin entre 3T_2 et 3E . On a $\tau_m = 36^\circ$ et l'angle dièdre maximum 35° entre 2' et 3'. La conformation **2.42**, $P = 175^\circ$, est assez voisine de 2T_3 . L'angle dièdre maximum est encore entre 2' et 3', -41° . Le fait qu'une même molécule puisse se trouver sous deux conformations différentes dans le même cristal est en soi révélateur de leur faible différence d'énergie. C'est tout de même inhabituel et les nucléosides-nucléotides se répartissent également entre $0 < P < 36^\circ$ et $144 < P < 180^\circ$ avec peu d'exceptions.

2.10 POLYOLS NON CYCLIQUES

Prenons comme exemple le galactitol à l'état solide, **2.43**. La molécule a la forme d'un zigzag plan. C'est la disposition favorite en solution, sauf si elle conduit à des interactions éclipsées 1,3 des hydroxyles. Dans ce dernier cas, la molécule se tord en forme de faucille. Cette conformation dérive du zigzag plan par rotation de 120° autour d'une liaison C-C interne. On observe la conformation faucille sur le diéthyl dithioacétal du D-ribose peracétylé **2.44**.

RÉFÉRENCES

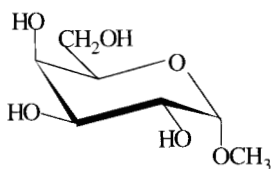
- [1] G. A. Jeffrey et M. Sundaralingam, *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 30 (1974) 445-466 ; 31 (1975) 347-371 ; 32 (1976) 353-384 ; 34 (1977) 345-378 ; 37 (1980) 373-436 ; 38 (1981) 417-529 ; 43 (1985) 203-421.
- [2] H. Paulsen, *A.C.S. Symposium Series*, 87 (1979) 63-79.
- [3] C. Cone et L. Hough, *Carbohydr. Res.*, 1 (1965) 1-9.
- [4] W. L. Jorgensen, R. C. Binning, Jr. et B. Bigot, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 4393-4399.
- [5] W. L. Jorgensen et M. Ibrahim, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 3976-3985.
- [6] E. L. Eliel, K. D. Hargrave, K. M. Pietrusiewicz et M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 3635-3643.
- [7] M. C. Planje, L. H. Toneman et G. Dallinga, *Rec. Trav. Chim.*, 84 (1965) 232-240.
- [8] C. B. Anderson et D.T. Sepp, *J. Org. Chem.*, 32 (1967) 607-611.
- [9] C. T. Bishop et F. P. Cooper, *Can. J. Chem.*, 41 (1963) 2743-2758.
- [10] P. L. Durette et D. Horton, *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 26 (1971) 49-125.
- [11] B. Aebersch, R. Hollenstein et A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 66 (1983) 1748-1754.
- [12] E. A. C. Lucken, *J. Chem. Soc.*, (1959) 2954-2960.
- [13] S. David, *A.C.S. Symposium Series*, 87 (1979) 1-16.
- [14] I. Tvarosvka, *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 47 (1989) 45-123.
- [15] E. E. Astrup, *Acta Chem. Scand.*, 25 (1971) 1494-1495.
- [16] J. Augé et S. David, *Tetrahedron*, 40 (1984) 2101-2106.
- [17] B. Casu *et al.*, *Nature*, 322 (1986) 215-216.
- [18] C. Altona et M. Sundaralingam, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94 (1972) 8205-8212.

Alkyl et aryl glycosides Glycosylamines

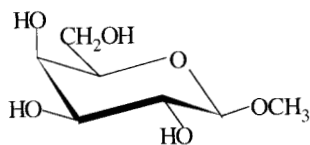
3.1 DÉFINITIONS RELATIVES AUX GLYCOSIDES (O-GLYCOSIDES)

Les furanoses et les pyranoses sont des hémiacétals. Les *glycosides* sont les acétals correspondants. Ils dérivent *sur le papier* des furanoses et des pyranoses par le remplacement de l'hydrogène de l'hydroxyle hémiacétalique par un radical carboné. Ce sont donc des acétals mixtes, internes et *externes*, où un des oxygènes acétaliques provient de l'une des fonctions alcool du sucre, et l'autre d'un composé hydroxylé extérieur R-OH. Il s'ensuit qu'à chaque pentose ou hexose correspondent quatre types de glycosides. Par exemple, on voit ci-dessous les formules des quatre glycosides dérivés du galactose par remplacement de l'hydrogène hémiacétalique par un méthyle, appelés méthyl α -D-galactopyranoside **3.1**, méthyl β -D-galactopyranoside **3.2**, méthyl α -D-galactofuranoside **3.3**, et méthyl β -D-galactofuranoside **3.4**.

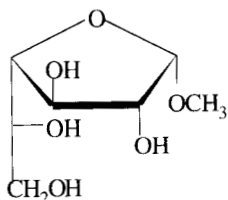
La définition que nous avons donnée inclut le cas où le dérivé hydroxylé R-OH correspondant au substituant R *externe* appartient à la famille des sucres et, effec-



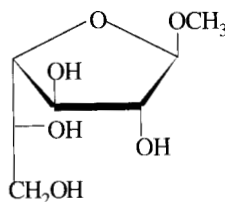
3.1



3.2



3.3



3.4

tivement, la liaison correspondante se comporte exactement comme les autres du point de vue chimique ; dans tous les cas, cette liaison entre les deux groupes par une fonction acétal s'appelle *liaison glycosidique*. Dans la pratique, ces deux catégories de glycosides, suivant que R-OH est ou n'est pas un sucre, jouent des rôles très différents qui justifient un traitement séparé. Les glycosides où R = méthyl, éthyl, phényl, benzyl, etc. sont très importants comme intermédiaires synthétiques. Ce sont eux que l'on désigne en général sous le nom de glycosides et qui font l'objet du présent chapitre. La partie « sucre » s'appelle *unité glycosidique* et le radical extérieur, aglycone. De l'examen des noms des dérivés **3.1**, **3.2**, **3.3** et **3.4**, le lecteur déduira les règles de nomenclature. Le nom commence par le radical désignant l'aglycone, suivi du nom qui indique la configuration de l'unité glycosidique, où la terminaison « ose » du sucre libre est remplacée par « oside ».

Si R-OH est un sucre, on emploiera de préférence le terme *disaccharide*. D'ailleurs l'association de beaucoup plus de deux molécules de sucres simples peut se poursuivre par le même type de liaison. Ces associations dont certaines jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire seront traitées en détail à partir du chapitre 9.

3.2 SYNTHÈSE DES ALKYL GLYCOSIDES PAR LA MÉTHODE DE FISCHER^{[1] [2] [3] [4]}

3.2.1 Aspect expérimental

En catalyse acide, on observe un équilibre entre un pentose ou un hexose et un alcool aliphatique ou benzylique, d'une part, et l'acétal mixte correspondant et l'eau, d'autre part, conformément à la figure 3.1. On s'intéresse d'abord à la synthèse. La réaction est déplacée vers la droite par l'utilisation d'un gros excès d'alcool ROH, généralement employé comme solvant. Par exemple, en faisant bouillir à reflux une solution de galactose dans le méthanol contenant 2 % de HCl, on obtient après 12 h un mélange en équilibre du sucre de départ avec les galactosides **3.1**, **3.2**, **3.3** et **3.4**. Cette réaction de *glycosidation* est générale. Comme toujours, il ne se forme que des cycles à cinq ou six éléments et les seules fonctions alcool internes impliquées sont celles portées par C-4 ou C-5. On l'observe donc avec les pentoses et les hexoses qui présentent au moins une fonction alcool libre en γ ou δ du carbonyle (aldéhydrique ou cétonique).

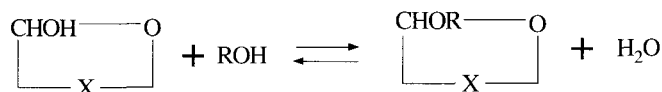


Figure 3.1 Réaction de glycosidation.

Cependant la composition du mélange en équilibre varie largement d'un sucre à un autre (Tableau 3.1). On dose les constituants par les méthodes que nous avons

	T	Furanosides		Pyranosides	
		α	β	α	β
glucose*	35°C	0,6	0,9	66	32,5
mannose*	35°C	0,7	0	94	5,3
galactose*	35°C	6	16	58	20
fucose**	65°C	6	13	54	27
ribose*	35°C	5	17	12	66
fructose***	28°C	25	26	3	46

Tableau 3.1 Méthanolyse acide : composition à l'équilibre du mélange de méthyl glycosides. (* D'après R. J. Ferrier et P. M. Collins, *Monosaccharide Chemistry*, (chapitre 3) Penguin Books, Harmondsworth, 1972 ; ** d'après D. F. Mowery, *Carbohydr. Res.*, 43 (1975) 233-238 ; *** d'après G. S. Bethell et R. J. Ferrier, *Carbohydr. Res.*, 31 (1973) 69-80 ; publié avec les aimables autorisations de Penguin Books et de Elsevier Science.)

esquissées au chapitre 1 à propos du dosage des anomères des sucres libres, c'est-à-dire HPLC analytique ou chromatographie de vapeur après silylation. Ici les mesures sont beaucoup plus faciles, car, dès qu'ils ne se trouvent plus dans un milieu relativement acide, les glycosides sont très stables et il n'y a pas de risque que la composition de l'échantillon varie après le prélèvement au cours du dosage. La composition de ces mélanges est évidemment reliée à la différence des enthalpies libres de chaque constituant. On observe quelques comportements réguliers. Les pyranosides sont favorisés par rapport aux furanosides, presque absents dans le cas du glucose et du mannose. Dans le cas de pyranosides à conformation stable, tels les gluco-, manno- et galactopyranosides, c'est le dérivé à méthoxyle axial qui prédomine, ce qui est une manifestation de l'effet anomérique.

Si, au lieu d'examiner la composition à l'équilibre, on suit le déroulement temporel de la glycosidation on observe que les furanosides se forment au départ, pour disparaître ensuite plus ou moins complètement au profit des pyranosides.

3.2.2 Rôle préparatif et limites d'utilité

On procède toujours comme dans le cas du galactose décrit ci-dessus, avec l'alcool comme solvant. On peut commencer par essayer de chauffer quelques heures vers 80°C en présence d'un acide minéral, à une molarité voisine de 0,1 – 1 M. Il faudra ensuite déterminer les meilleures conditions. Celles que nous venons de donner transformeraient quantitativement le désoxyribose en acide lévulinique, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$. Mais avec tous les sucres 2-déoxy, la glycosidation est très rapide dans des conditions beaucoup plus douces. Par exemple, la conversion du désoxyribose en méthyl glycosides est complète en 20 mn à 27°C dans l'acide chlorhydrique méthanolique 0,015 M.

Si le glycoside ne cristallise pas directement du milieu réactionnel, il faut éliminer l'acide minéral catalyseur, et ceci peut poser problème, car en général les

glycosides sont très solubles dans l'eau et il est impossible de les extraire avec des solvants organiques. Il est très commode d'utiliser comme catalyseur une résine échangeuse de cations sous forme hydrogène, que l'on sépare par filtration en fin d'opération. Ainsi, pour préparer le méthyl α -D-glucopyranoside, on fait bouillir à reflux une solution de 80 g de glucose anhydre dans 200 mL de méthanol pendant 24 h en présence de 20 g de l'échangeur de cations Dowex 50 (H^+). On filtre, concentre, ce qui amène une cristallisation spontanée, et on recristallise dans le méthanol puis l'éthanol, ce qui donne 25 g (29 %) de méthyl α -D-glucopyranoside pur^[5]

A ce stade, il faut se pénétrer de l'idée que dans ces synthèses, qui n'impliquent qu'un petit nombre d'étapes, au départ de sucres banaux, la course aux rendements élevés n'a plus grande signification. Ce qui compte, c'est la simplicité d'opérations. En France, le kilogramme de glucose, au degré de pureté nécessaire à la recherche, vaut 53 FF. La purification d'un dérivé de ce kilogramme de glucose par chromatographie exigerait au minimum 20 kg de gel de silice (prix 3 560 FF) et 60 L de solvant (environ 600 FF). Il est beaucoup plus économique d'utiliser une méthode qui ne nécessite que des cristallisations, quitte à augmenter l'échelle de travail si son rendement est faible. C'est en général le constituant majoritaire de la solution qui cristallise, c'est-à-dire le pyranoside dont l'alkoxy-le anomérique est axial ; ce n'est toutefois pas une règle absolue. Donc, le plus souvent, la préparation du pyranoside à alkoxy-le anomérique équatorial par la méthode de Fischer implique une cristallisation fractionnée assez pénible des eaux-mères et on fait plutôt appel à une autre méthode.

Pour obtenir les furanosides, on peut essayer d'interrompre la glycosidation à son début, au moment où leur concentration est maximum. Par exemple, en faisant bouillir à reflux une solution de galactose dans le chlorure d'hydrogène méthanolique 0,004 M pendant 6 h, on peut obtenir le méthyl β -D-galactofuranoside avec 53 % de rendement^[6]. Dans cette préparation, on a ralenti l'établissement de l'équilibre en utilisant une très faible concentration de catalyseur. Mais ces conditions sont rarement aussi idéales.

Le remplacement du catalyseur acide protonique par du chlorure ferrique, acide de Lewis modéré, donne exclusivement le mélange de furanosides. On peut ainsi obtenir le mélange de méthyl D-glucofuranosides ($\alpha/\beta = 3/7$) avec 75 % de rendement^[7]. Une autre voie d'accès à un furanoside repose sur la complexation intermédiaire par les ions Ca^{++} . L'ensemble de ces complexations sera traité au chapitre 11. En faisant bouillir à reflux une solution de mannose et de $CaCl_2$ dans le méthanol en présence de chlorure d'acétyle comme source de protons pendant 2 h, on obtient 53,5 % de méthyl β -D-mannofuranoside, isolable avec 40 % de rendement^[8]. Enfin, l'application de la glycosidation selon Fischer à un sucre dont la fonction alcool sur C-5 est bloquée ne donne évidemment que des furanosides.

Ici apparaissent donc les limites d'utilité de la méthode de Fischer : il faut que l'alcool soit utilisé en grand excès, de préférence comme solvant, pour déplacer

l'équilibre dans le sens voulu. Les anomères à alkoxy anomérique équatorial sont difficilement isolables. Il n'y a pas de réaction utilisable avec les phénols et les aryl glycosides ne sont pas accessibles.

3.3 AUTRES MÉTHODES DE PRÉPARATION DES GLYCOSIDES

3.3.1 Activation du carbone anomérique

Dans la réaction de Fischer, on imagine que le rôle du catalyseur acide est de protoner l'hydroxyle anomérique, le transformant ainsi en groupe partant (Fig. 3.2), ce qui facilitera la substitution nucléophile. Dans les méthodes que nous allons décrire, il y a un groupe partant stable sur C-1, ce qui n'empêche pas l'utilisation de réactifs d'activation supplémentaire, les « promoteurs » introduits dans le milieu. Ces méthodes, plus longues à mettre en œuvre que la glycosidation selon Fischer et très variées, servent essentiellement à la synthèse d'oligosaccharides : elles seront analysées en détail au chapitre 10. Elles sont toutes utilisables à la synthèse des glycosides simples.

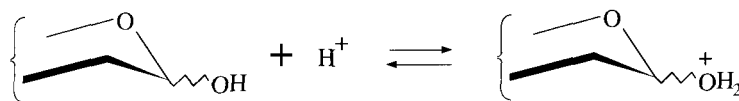
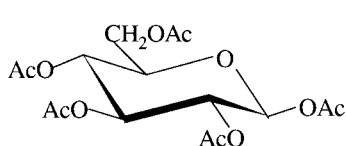


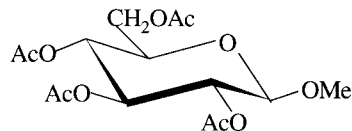
Figure 3.2 Intermédiaire protoné dans la réaction de glycosidation.

Ainsi dans le peracétate du β -D-glucopyranose **3.5**, le groupement acétoxy anomérique a une labilité particulière. Il est remplacé par un méthoxy en présence de SnCl_4 pour donner le méthyl tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranoside **3.6**^[9]. Ce type d'activation peut se révéler insuffisant. On a proposé un promoteur plus efficace que SnCl_4 , mais beaucoup plus coûteux, le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle, $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{SiMe}_3$. Aussi, pour une préparation à grande échelle, préfère-t-on encore utiliser un bromure, aisément obtenu en traitant par HBr un peracétate de β -D-glycopyranosyle tel que **3.5**. On prépare ainsi le bromure de tétra-*O*-acétyl-galactopyranoside **3.7**, qui donne le méthyl β -D-galactoside peracétylé **3.8** avec le méthanol en présence d'un mélange de HgO (1 eq.) et de Hg Br_2 (0,04 eq.). Le rendement global à partir du galactose est de 24 %. On remarquera l'orientation équatoriale du méthoxy entrant dans les deux cas, indépendante de la configuration du produit de départ. Nous verrons plus en détail au chapitre 10 comment la participation du groupement acétoxy en 2 impose la configuration *trans*-1,2 du produit. Le rendement de la substitution proprement dite est en général excellent.

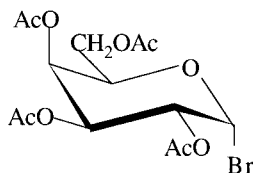
En résumé, les alkyl glycosides avec une aglycone axiale sont aisément obtenus par la réaction de Fischer, qu'ils soient *cis*-1,2 ou *trans*-1,2. Les alkyl glyco-



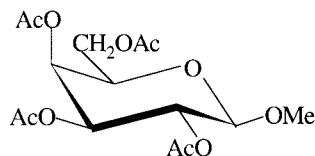
3.5



3.6

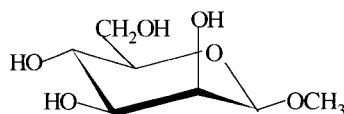


3.7



3.8

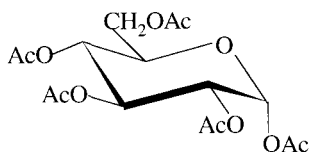
sides *trans*-1,2 diéquatoriaux résultent de réactions de participation. Restent les *cis*-1,2 avec une aglycone équatoriale comme le β -D-mannoside **3.9**. On obtient **3.9** avec 30 % de rendement après isolement par addition simultanée de sulfate de méthyle et d'hydroxyde de sodium à une solution aqueuse de mannose^[10].



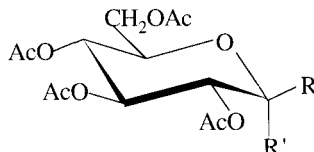
3.9

3.3.2 Aryl glycosides

On ne peut pas les obtenir par la réaction de glycosidation de Fischer. Peut-être l'hydroxyle alcoolique est-il insuffisamment nucléophile, par comparaison avec l'hydroxyle alcoolique. Mais on peut les préparer assez facilement à partir des acétates en présence de catalyseurs acides. La fusion d'un mélange du peracétate de l' α -D-glucopyranose **3.10** et de phénol donne 64 % de phényl α -D-glucopyranoside tétraacétylé **3.11** en présence de chlorure de zinc et 85 % de l'anomère β **3.12** en présence d'acide paratoluènesulfonique^[1]. Le cours de la réaction dépend donc fortement des conditions expérimentales. Chaque fois que l'on obtient un alkyl ou aryl glycoside sous forme tétraacétylée, il est facile, si cela s'avère nécessaire, de libérer les fonctions alcool par méthanolyse alcaline, car la liaison acétalique est très stable dans les bases.



3.10

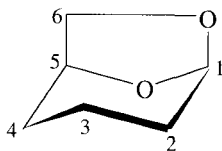


3.11 R=H, R'=OPh

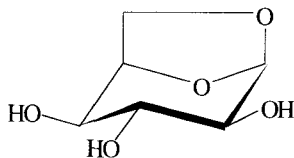
3.12 R=OPh, R=H

3.4 ANHYDROPYRANOSSES ET ANHYDROFURANOSSES À CARACTÈRE ACÉTALIQUE

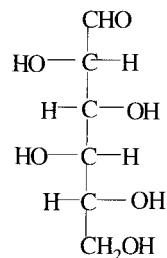
Le lecteur se sera peut-être demandé pourquoi, dans la réaction de Fischer, il n'y a pas acétalation par *deux* fonctions alcool de la molécule de sucre, conduisant à un acétal mixte complètement interne et bicyclique. En règle générale, une réaction intramoléculaire est plus rapide que l'analogie intermoléculaire ; ce type de composé est observé dans d'autres familles que les sucres. La réponse pourrait être qu'on prépare les alkyl glycosides en présence d'un gros excès d'alcool. En fait, ces acétals internes dérivés de sucres sont une famille de composés bien connus et parfaitement stables en conditions non acides. On les nomme comme des dérivés de pyranose ou furanose, par exemple un *x, y-anhydro-β-D-pyranose* est un *β-D-pyranose* avec un pont éther entre les carbones de rang *x* et *y*. Nous traiterons pour commencer des *1,6-anhydro-β-D-pyranoses*, c'est-à-dire l'acétal mixte interne entre la fonction aldéhyde et l'hydroxyle porté par le carbone 6. Le squelette général de ces composés est **3.13**. La conformation du cycle pyranose est la conformation *D-¹C₄* inexistante avec les pyranoses libres. Elle présente un effet anomérique favorable mais une disposition axiale de la chaîne latérale inacceptable dans le cas d'un pyranose libre. Il est difficile de prévoir sa contribution à l'énergie libre de la molécule, puisqu'il y a fermeture d'un nouveau cycle. Il est en tout cas certain qu'un substituant axial en C-3 introduit une forte compression stérique. Le représentant le plus stable de la série doit être le triéquatorial **3.14**, dérivant du D-idose **3.15**. Nous avons mentionné au chapitre 2 l'instabilité



3.13



3.14



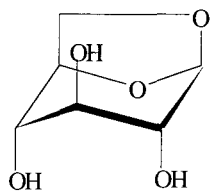
3.15

conformationnelle de ce sucre. Par chauffage en solution aqueuse, en présence d'un acide dilué, il donne le 1,6-anhydride avec un rendement de 86 %. C'est donc, de loin, la configuration la plus stable en solution. Par contre, les trois sucres glucose, mannose et galactose ne donnent que des traces de 1,6-anhydride dans ces conditions. On prévoit en effet une puissante interaction 1,3-diaxiale entre CH_2 et l'hydroxyle en 3 pour ces trois configurations, comme par exemple dans le 1,6-*anhydro*-D-glucose **3.16**. A titre d'exercice, le lecteur pourra interpréter en termes d'analyse conformationnelle les rendements de conversion en 1,6-anhydrides des sucres suivants en solution acide à 100°C ^[11] : glucose (0,2 %) ; mannose (0,8 %) ; galactose (0,8 %) ; talose (2,8 %) ; allose (14 %) ; gulose (65 %) ; altrose (65 %) ; idose (86 %). Il trouvera les configurations de ces hexoses au chapitre 4.

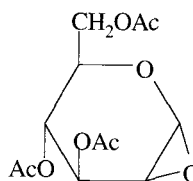
Alors qu'en milieu acide, ces anhydrides sont en équilibre avec des quantités variables d'hexoses correspondant, ils sont très stables en milieu alcalin, comme tous les glycosides, et les acétals d'une façon générale. On peut préparer ceux qui sont instables en milieu acide par une réaction très originale et très efficace, le chauffage à 100° d'un aryl β -D-glycopyranoside peracétylé. Ainsi, le phényl tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside **3.12** donne-t-il le 1,6-*anhydro*-D-glucose **3.16**, facilement isolable avec un rendement de 80 % par peracétylation et recristallisation du peracétate hautement cristallin^[12]. La réaction fait apparemment intervenir un intermédiaire 1,2-*anhydro*, car elle ne se produit pas si l'hydroxyle en 2 du glucoside est bloqué par méthylation et l'anomère α **3.11** n'est pas réactif.

Lorsqu'un pyranose est transformé en 1,6-anhydropyranose, les hydroxyles axiaux deviennent équatoriaux et vice versa. C'est sans doute la propriété la plus intéressante du point de vue synthétique à cause du changement de réactivité. Mais il y a des limites à l'utilité des 1,6-anhydro ; l'espace *endo* entre l'oxolane et l'oxane est très peu accessible et les nucléophiles s'y introduisent difficilement, si bien qu'il peut être difficile de substituer les hydroxyles activés par la réaction $\text{S}_\text{N}2$ impliquant l'attaque *endo*. Pour finir, notons que l'on sait également préparer certains 1,4-anhydropyranoses.

Les anhydrides 1,2 se comportent comme des oxiranes très réactifs. D'ailleurs on prépare **3.17** comme un oxirane, par attaque d'un carbone chloré par un alcoolate vicinal, dans ce cas l'action de l'ammoniac sur un dérivé du glucose chloré en 1 avec un hydroxyle libre en 2. On a préconisé récemment l'époxydation des

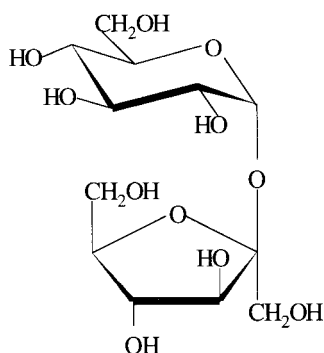
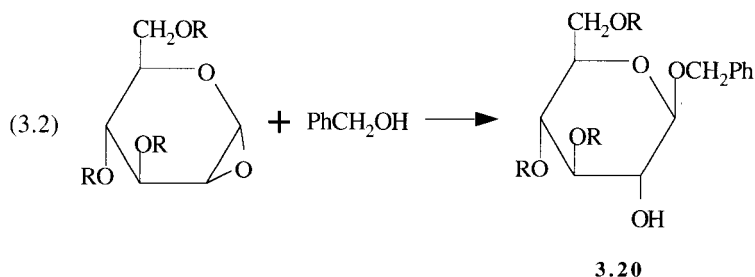
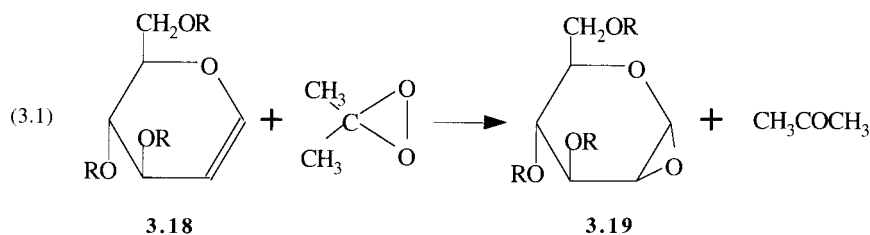


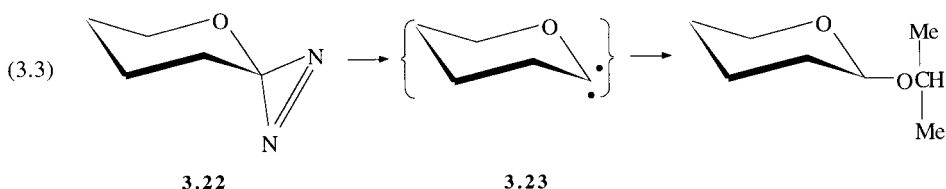
3.16



3.17

glycols tel **3.18** par le diméthylldioxirane^[13]. Lorsque la protection R est le fait de benzyles, ou de *ter*-butyldiméthylsilyles, on observe l'introduction spécifique de l'oxygène en *trans* de l'oxygène en 3 (Equation (3.1) ; produits **3.18** et **3.19**). Ces oxiranes sont ouverts à froid, *sans catalyseur*, par les alcools primaires (CH_3OH , PhCH_2OH), avec inversion de configuration et donnent presque quantitativement les glycosides 1,2-*trans*, **3.20** (Equation (3.2)). Le composé **3.17** a permis la synthèse du saccharose **3.21** par une réaction superficiellement analogue, mais évidemment plus complexe, puisqu'il y a rétention de configuration, qu'il faut opérer 100 h à 100°C , et que le rendement est faible^[14]. On connaît d'autres dérivés de sucres qui se transforment en glycosides à froid sans catalyseur. Les diazirines, **3.22** par exemple, peuvent donner des glycosides, même avec des alcools secondaires (Equation (3.3)). L'intermédiaire est probablement le carbène **3.23**^[15].

**3.21**



3.5 PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES GLYCOSIDES

3.5.1 Hydrolyse en milieu acide^{[16], [17], [18]}

En présence d'un excès d'eau, la réaction réversible de la figure 3.1 se déroule évidemment de droite à gauche. Les glycosides en solution aqueuse sont décomposés par les acides. Cette réaction a suscité un intérêt passionné. Il y aurait déjà eu « des milliers d'articles » en 1979^[16]. Le mécanisme le plus généralement admis semble être celui de J. T. Edward (1955)^[19]. L'intermédiaire, protoné réversiblement sur l'oxygène exocyclique évolue vers l'ion carbénium « cation glycosyle », ou subit une substitution bimoléculaire par une molécule d'eau (Fig. 3.3). Avec une durée de vie dans l'eau de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-12} seconde, le cation glycosyle serait « à la limite de l'existence réelle »^[20]. L'environnement serait nécessairement impliqué dans les réactions d'un intermédiaire aussi instable.

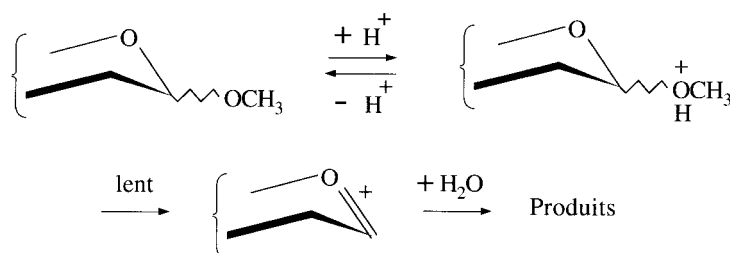


Figure 3.3 Mécanisme proposé pour l'hydrolyse des glycosides.

D'une façon plus générale, S étant le glycoside, on a le chemin réactionnel (3.4) ;



La vitesse globale est proportionnelle à $[SH^+]$ puisque la concentration en eau est pratiquement constante. Comme S est une base très faible, sa protonation est équilibrée selon l'égalité (3.5) et la vitesse de réaction est alors donnée par l'expression (3.6).

$$(3.5) \quad \frac{[S][H^+]}{[SH^+]} = K$$

$$(3.6) \quad v = k' [SH^+] = \frac{k'}{K} [H^+] [S]$$

En présence d'un excès de glycoside, la constante de vitesse pseudo-monomoléculaire k est proportionnelle à la concentration en ions hydronium (Equation (3.7)).

$$(3.7) \quad k = \lambda [H^+]$$

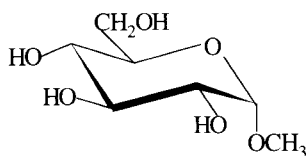
En toute rigueur, il faudrait introduire l'activité des ions hydronium, car on opère parfois dans des solutions acides concentrées (HCl 2,5 M, H₂SO₄ 2 M, etc.). On a aussi fait intervenir les fonctions d'acidité dans les études mécanistiques, mais le fondement même de la théorie des fonctions d'acidité a donné lieu récemment à de vives critiques^[21]. Il suffira pour une discussion qualitative de confondre activité et concentration. Il y a tellement de variations possibles dans les conditions de mesure, selon la nature et la concentration de l'acide et selon la température, et l'éventail des valeurs de k est si étalé, qu'il est difficile de présenter les résultats d'une façon à la fois uniforme et rigoureuse. Un auteur^[18] a choisi de calculer la valeur k_r de la constante de vitesse à 100°C, dans HCl normal à partir de sa valeur k à t°C, dans l'acide de concentration molaire c , par la relation (3.8) qui suppose connue l'énergie d'activation $E^\ddagger$ (en cal mol⁻¹).

$$(3.8) \quad \log k_r = \log k + \frac{E^\ddagger}{4.575} \left(\frac{1}{273 + t} - \frac{1}{373} \right) - \log c$$

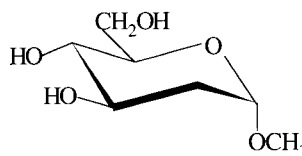
L'expression (3.9) donne les durées de demi-réaction en minutes, plus parlantes pour le chimiste de synthèse.

$$(3.9) \quad t_{1/2}/mn = \frac{0,69}{k / mn^{-1}}$$

On trouvera sur le tableau 3.2 des résultats caractéristiques pour quelques glucosides banals ainsi que pour les composés **3.24**, **3.25**, **3.26**, **3.27**, **3.28**, **3.29**, **3.30** et **3.31**. Certaines extrapolations, loin des conditions réelles de mesure sont sans doute irréalistes, surtout pour les glycosides très labiles. Néanmoins le tableau 3.2



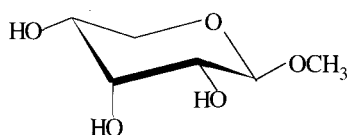
3.24



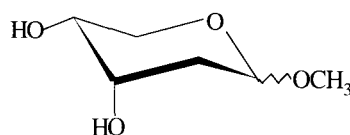
3.25

Exemple	Glycoside	$t_{1/2}/\text{mn}$
1	Méthyl α -D-glucopyranoside (3.24)	32
2	Méthyl β -D-glucopyranoside	19
3	Ethyl β -D-glucopyranoside	13
4	Phényl α -D-glucopyranoside	1,2
5	Ethyl β -D-glucofuranoside	0,06
6	Méthyl α -D-galactopyranoside (3.1)	6
7	Méthyl β -D-ribosepyranoside (3.26)	4
8	Méthyl 2-déoxy- α -D- <i>arabino</i> -hexopyranoside (3.25)	0,02
9	Méthyl 2-déoxy- α , β -D- <i>erythro</i> -pentopyranoside (3.27)*	< 0,005
10	Méthyl 6-déoxy- α -L-galactopyranoside (3.28)**	1
11	Méthyl 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranoside (3.29)	100
12	Méthyl 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranoside, chlorhydrate (3.30)	2800
13	<i>ter</i> -Butyl β -D-glucopyranoside	0,075
14	Triéthylméthyl β -D-glucopyranoside	0,003
15	Méthyl α -D-fructopyranoside (3.31)	0,003

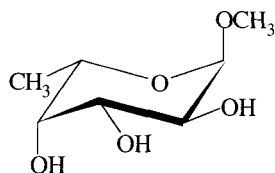
Tableau 3.2 Comparaison des vitesses d'hydrolyse de glycosides. (* Estimation ; ** mesure faite sur l'énantiomère.)



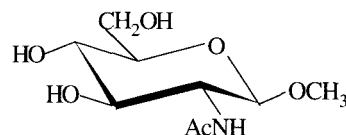
3.26



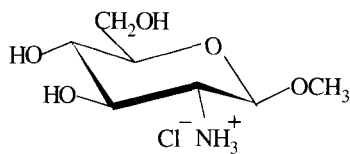
3.27



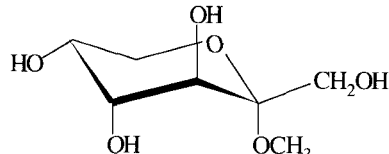
3.28



3.29



3.30

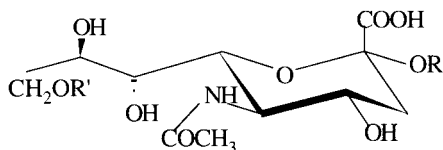


3.31

donne probablement une base de comparaison satisfaisante. Le lecteur qui voudrait exploiter numériquement les données publiées est renvoyé aux ouvrages cités.

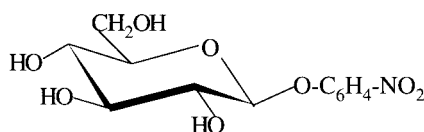
Les exemples 1 et 2 de ce tableau 3.2 montrent que l'anomère à méthyle équatorial est hydrolysé environ deux fois plus vite que l'anomère à méthyle axial. C'est une propriété de la plupart des couples de glycosides. Notons cependant qu'avec ces glucopyranosides, l'ordre s'inverse au-dessus de 132°C. Le changement du méthyle en éthyle n'a pas un effet considérable, mais la vitesse d'hydrolyse des phényl glycosides est nettement plus élevée (exemples 1 et 4). La comparaison des exemples 3 et 5 montre l'extrême labilité des furanosides. Lorsqu'il n'y a pas d'hydroxyle en position 2, l'hydrolyse est également considérablement accélérée (comparez les exemples 1 et 8 d'une part, 7 et 9 d'autre part). C'est l'extension à la chimie des glycosides d'une propriété bien connue des acétals simples : l'hydrolyse du diéthyl acétal $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CH}(\text{OEt})_2$ est 300 fois plus lente que celle de $\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{OEt})_2$. L'effet se manifeste aussi, mais très atténué, lorsqu'il y a un hydroxyle manquant à une position plus éloignée de la fonction acétal : comparer les exemples 6 et 10. Le composé **3.28** est un glycoside du fucose, qui est un sucre important dans des cellules vivantes ; il faut tenir compte de cette labilité particulière en chimie des oligosaccharides fucosylés.

Les pyranosides à fonction amide, comme **3.29** et son isomère *D-galacto*, ont une importance considérable dans les cellules vivantes. Lors de l'hydrolyse acide de la fonction acétal de **3.29** à 80°C dans HCl N ($k = 7,25 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), on observe l'hydrolyse simultanée de l'amide ($k = 2,13 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), ce qui conduit, pour une fraction notable du produit de départ, à l'accumulation du glycoside aminé **3.30** protoné dans le milieu. La charge positive sur l'azote s'oppose à la protonation de l'oxygène acétalique, qui donne un dication, si bien que l'hydrolyse de **3.30** est très lente. Comparez à ce sujet les exemples 1, 11 et 12. Les oligosaccharides des parois cellulaires contiennent des unités *N*-acétylglucosamine ou *N*-acétylgalactosamine rattachées à la chaîne par des liaisons glycosidiques et la détermination des conditions exactes de séparation de ces unités par hydrolyse acide est particulièrement importante. Enfin l'exemple 15 montre la fragilité des cétosides. Parmi les sucres cétoniques naturels, il en est un qui nous intéresse tout particulièrement, c'est l'acide sialique, dont les glycosides sont hydrolysés dans des conditions très modérées : les glycosides de l'acide sialique combinent les propriétés des glycosides cétoniques et celles des sucres désoxygénés au voisinage immédiat de la fonction acétal. L'acide sialique, sous forme sialoside, occupe une position périphérique dans les oligosaccharides des parois cellulaires, schématisée selon la structure **3.32**. On le sépare quantitativement par un chauffage d'une heure dans HCl 0,1 M à 80°C. Parfois l'acide sialique se présente sous une forme acétylée, telle que **3.33**. Le problème analytique est alors d'hydrolyser sélectivement sans désacétyler, et on emploie HCl 0,01 M ou l'acide formique, une heure à 60°C, mais l'hydrolyse de la fonction glycosidique n'est pas totale dans ces conditions^[22].



3.32 R'=H

3.33 R'=Ac



3.34

On notera, sur les exemples 13 et 14, l'énorme labilité des glycosides d'alcools tertiaires. On pense que leur hydrolyse s'effectue par un mécanisme différent de celui de la figure 3.2, faisant intervenir, comme pour les halogénures de ces alcools, un ion carbénium, tel Me_3C^+ .

Les études cinétiques permettent de calculer les grandeurs d'activation, reliées par la formule (3.10).

$$(3.10) \quad \Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Pour 24 pyranosides, à 60° C, on observe la relation numérique (3.11) ; d'autres valeurs publiées sont du même ordre.

$$(3.11) \quad +4,1 \leq \Delta S^\ddagger / \text{cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1} \leq 23,0$$

moyenne : 13,7

Sur un nombre restreint de furanosides, on a observé, au contraire, une valeur négative^[17].

$$-11,1 \leq \Delta S^\ddagger \leq -8,3$$

On interprète ces chiffres comme l'indication d'un mécanisme d'hydrolyse différent^[16].

3.5.2 Hydrolyse et transfert enzymatiques

Les enzymes glycoside-hydrolases, plus simplement « glycosidases », catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans des conditions voisines de la neutralité. On a donné dans le tableau 3.3 une liste de glycosidases commerciales, dont le prix est suffisamment modéré pour qu'on puisse en envisager l'utilisation en chimie préparative. L'efficacité de cette catalyse est prodigieusement augmentée par rapport à celle de la catalyse acide. La comparaison directe avec les alkyl glycosides n'est pas possible, car il n'y a pas d'hydrolyse non enzymatique perceptible au voisinage de la neutralité, mais on peut mesurer une vitesse de réaction au pH 5 avec le β -D-glucopyranoside du paranitrophénol **3.34**. Dans l'eau à 25° C, pH 5,0, la très faible constante pseudo-monomoléculaire est $52 \times 10^{-12} \text{ s}^{-1}$. En présence de la β -D-glucosidase des amandes amères, dans les mêmes conditions, on mesure une valeur de k égale à 78 s^{-1} , soit environ 10^{12} fois plus élevée^[23].

Enzyme	Source	Type
α -D-Glucosidase	levure	p (a-a)
β -D-Glucosidase	amandes	p (e-e)
α -D-Galactosidase	grains de café vert	p (a-a)
β -D-Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	p (e-e)
α -D-Mannosidase	fève Jack	p (a-a)
α -D-Fucosidase	reins du bœuf	p (a-a)
α -D-Neuraminidase	<i>Arthrobacter ureofaciens</i> ,	p (e-e)
(Sialidase)	<i>Clostridium Perfringens</i>	—
N-acetyl- β -D-glucosaminidase	reins du bœuf	—
β -D-Fructosidase (Invertase)	levure	f (r)

Tableau 3.3 Propriétés de quelques glycoside – hydrolases commerciales.

On a aussi cherché à comparer les vitesses dans les conditions où elles obéissent toutes deux à une loi du second ordre, par rapport à la concentration en substrat et à celle du catalyseur. On trouve alors que l'enzyme est 10^{14} fois plus efficace que les ions hydronium. Un tel rapport de vitesse correspond à une chute de l'énergie d'activation voisine de 18 kcal mol^{-1} .

On distingue les « exoglycosidases » et les « endoglycosidases ». Les premières hydrolysent des liaisons glycosidiques terminales dans les chaînes oligosaccharidiques (voir le chapitre 9) et les secondes des liaisons internes. Dans le cadre de ce paragraphe, essentiellement consacré à la chimie préparative, nous traiterons exclusivement des premières, qui sont très nombreuses, car elles catalysent aussi l'hydrolyse d'alkyl et d'aryl glycosides. Chaque glycosidase est spécifique de la configuration du sucre qui intervient dans la liaison glycosidique par son oxygène anomérique. Elle est relativement indifférente à la nature du groupe organique lié à cet oxygène. Cette observation permet une classification en groupes : α -D-glucosidases qui hydrolysent tous les α -D-glucosides, β -D-galactosidases qui hydrolysent tous les β -D-galactosides, etc., avec, au sein de chaque groupe, de petites variations de propriétés suivant l'origine. Si maintenant on s'attache à la configuration, on voit qu'il y a quatre cas de figure *a, b, c, d* pour les pyranosides et deux cas de figure *e, f* pour les furanosides (Fig. 3.4). L'hémiacétal au second membre est représenté tel qu'il est immédiatement après sa séparation du site actif. Les hydrolyses procèdent globalement avec rétention de configuration (*a, b, e*) ou inversion (*c, d, f*). On adopte donc des symboles de classification, qui sont, dans l'ordre *a, b, c, d, e, f*, p (e-e), p (a-a), p (e-a), p (a-e), f (r), f (i). Toutes les glycosidases du tableau 3.3 fonctionnent avec rétention de configuration.

En raison de la rapidité de la mutarotation, il est difficile d'avoir une certitude sur la configuration anomérique de l'hémiacétal au départ de l'enzyme. La réponse est donnée par une autre réaction des glycosidases à rétention : elles catalysent

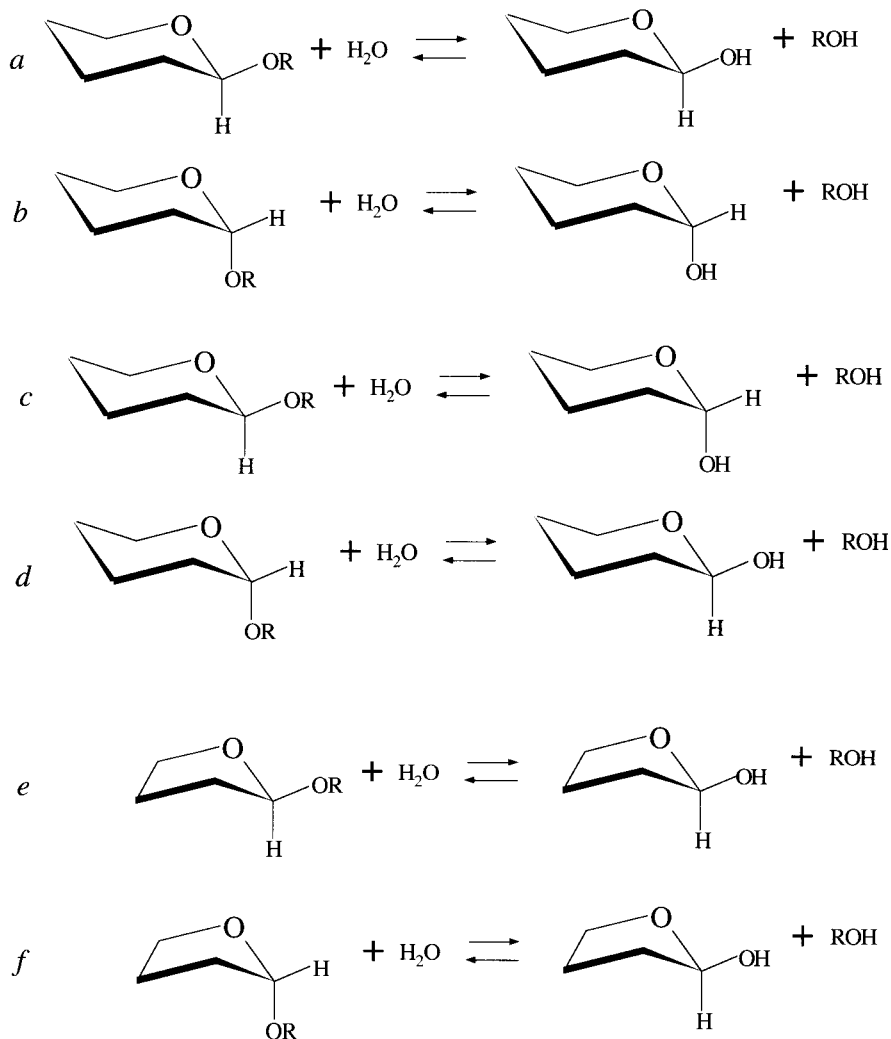
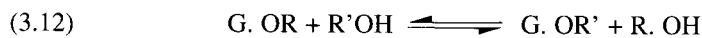


Figure 3.4 Chemins possibles d'hydrolyse enzymatique d'un glycoside.

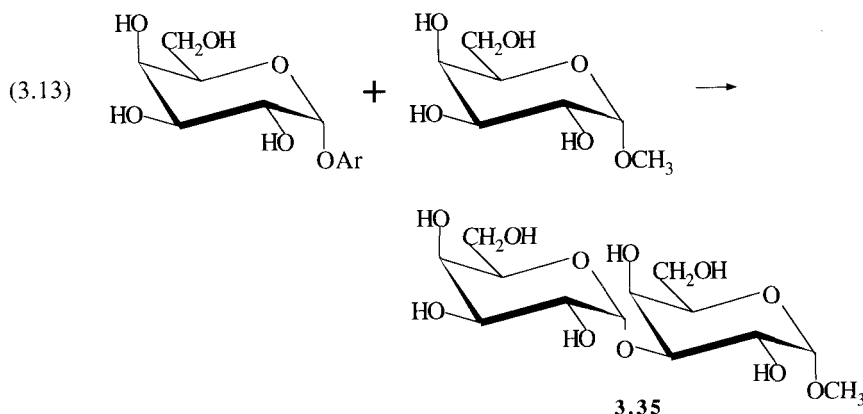
le transfert de glycosyl d'une aglycone à une autre, selon l'équation (3.12) où G-OR et G-OR' sont deux glycosides du sucre G-OH.



L'hydrolyse apparaît alors comme le cas particulier du transfert sur l'eau, H-OH. Il n'y a alors plus d'ambiguïté sur la configuration anomérique du glycoside produit, incapable de mutarotation. On trouve que c'est la même que celle du glycoside de départ. Cette conclusion s'impose d'ailleurs en fonction de la réversibilité de la réaction (3.12) par application du principe de microréversibilité. Si

la configuration anomérique n'était pas la même dans les deux membres, l'enzyme devrait pouvoir hydrolyser par le même chemin les deux configurations opposées.

La réaction (3.12) suggère des applications synthétiques des glycosidases autres que l'hydrolyse. Ainsi on observe la réaction (3.13) en solution aqueuse en présence d'une α -D-galactosidase.



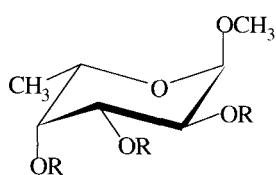
On fabrique ainsi très rapidement un disaccharide **3.35** caractéristique du groupe sanguin humain B. Le rendement est médiocre, mais les autres méthodes purement chimiques connues impliquent de nombreuses étapes et ne sont finalement pas plus performantes. Dans les méthodes à glycosidases, le rendement est faible, mais le coût des matières premières est négligeable par rapport à la valeur des oligosaccharides. L'inconvénient n'est pas là : il faut séparer les produits d'un gros excès de substances très voisines et très polaires, problème qui n'a pas encore de solution économique à grande échelle.

Le mécanisme de l'hydrolyse enzymatique est encore sujet à controverses^{[20] [23]}. Il y a accord sur un point : la rétention résulte de deux inversions consécutives, l'une lors de l'attachement à l'enzyme, et l'autre lors du transfert de glycosyl sur l'accepteur.

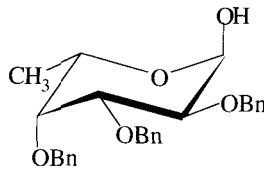
3.5.3 Stabilité des glycosides dans les conditions neutres ou alcalines

Rôle protecteur

Les glycosides ne sont hydrolysés en milieu alcalin que dans des conditions extrêmes, tout à fait étrangères à la pratique synthétique courante. Pour toutes les réactions qui s'effectuent en milieu neutre ou alcalin, les glycosides ont les propriétés des polyols cycliques. Les sucres hémiacétal ne supportent pas l'alcalinité, en raison du caractère d'aldol du tautomère carbonylé. Pour effectuer des transformations au niveau des hydroxyles impliquant des conditions alcalines, on a avantage à transformer d'abord le sucre en glycoside. Par exemple, le fucose benzylé **3.37** est un intermédiaire obligatoire dans l'activation du fucose pour l'intro-



3.28 R=H

3.36 R=CH₂Ph(Bn)

3.37

duction de l'unité α -fucopyranosyl dans les oligosaccharides. On le prépare en trois étapes : glycosidation du fucose en méthyl glycoside **3.28**, benzylation des hydroxyles avec le chlorure de benzyle et l'hydrure de sodium dans la *N,N*-diméthylformamide, ce qui donne **3.36** et finalement hydrolyse en **3.37**.

Le passage par le méthyl glycoside comme forme protégée et le retour final à l'hémiacétal par hydrolyse acide ne sont possibles que si le produit final est stable dans les conditions d'acidité nécessaires. Ainsi, s'il y avait des substituants acétyl au lieu de benzyl sur l'intermédiaire **3.36**, ils disparaîtraient partiellement au déblocage. La plupart des sucres eux-mêmes sont très stables en milieu acide. Cependant, le fructose se transforme partiellement en acide lévulique CH₃COCH₂CH₂COOH en milieu acide à 100° C. Quant au désoxyribose, il suffit de conditions acides très modérées pour qu'il se transforme quantitativement en acide lévulique. Le cas le plus fréquent est celui où le déblocage acide de la fonction protectrice risque d'hydrolyser d'autres liaisons glycosidiques, que l'on désire garder dans la molécule. Dans ce cas, on effectuera la protection en préparant un glycoside de l'alcool benzylique, le groupement protecteur étant éliminé dans des conditions neutres par hydrogénolyse sur palladium sur charbon (Fig. 3.5).

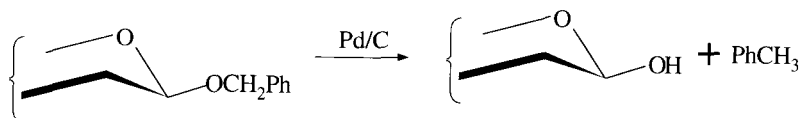


Figure 3.5 Hydrogénolyse catalytique.

3.6 GLYCOSYLAMINES ET NUCLÉOSIDES

3.6.1 Généralités

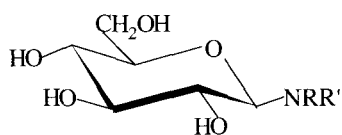
Nous traitons ici ces composés en raison de leur analogie de structure avec les glycosides oxygénés mais leur rôle est bien différent. Ce ne sont pas des intermédiaires souvent utilisés en synthèse. On trouve dans cette famille des structures

naturelles universellement répandues. Certaines transformations décrites ci-dessous sont des modèles valables de chemins biosynthétiques bien établis.

3.6.2 Glycosylamine^[24]

Préparation

Le traitement des aldohexoses ou aldopentoses par l'ammoniac liquide ou en solution alcoolique remplace l'hydroxyle anomérique par NH_2 , et donne un mélange anomérique de glycosylamines pyranosides. Le dérivé équatorial est prépondérant. On observe souvent sa cristallisation directe à partir du milieu réactionnel. Ainsi le glucose donne-t-il le β -D-glucosylamine **3.38**. Les amines primaires et secondaires aliphatiques conduisent aux glycosylamines substituées **3.39** et **3.40**. Avec les arylamines moins nucléophiles, il peut être nécessaire d'utiliser un catalyseur acide modéré comme un sel d'ammonium pour obtenir l'arylamine **3.41** en général bien cristallisée. Les cétones traitées comme ci-dessus donnent les cétosylamines alkylées sur l'azote, très labiles en milieu acide. On voit que les fonctions carbonylées des sucres libres ne donnent pas de bases de Schiff. On ne peut les obtenir avec les sucres aldéhydiques que si la formation de l'hémiacétal est rendue impossible par le blocage des fonctions alcool (on dit alors qu'on a affaire à un sucre *aldéhydo*).



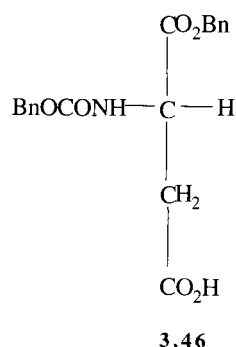
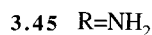
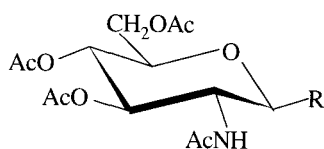
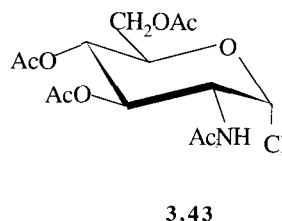
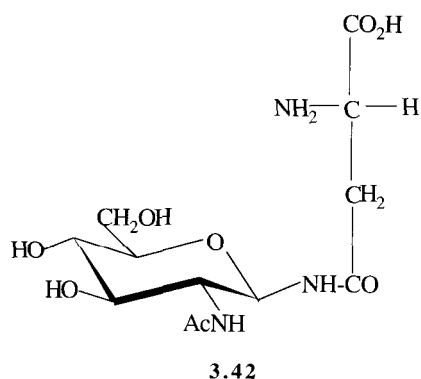
3.38 $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$

3.40 $\text{R}, \text{R}' = \text{alkyl}$

3.39 $\text{R}=\text{H}, \text{R}' = \text{alkyl}$

3.41 $\text{R}=\text{H}, \text{R}' = \text{aryl}$

Comme dans les synthèses de glycosides oxygénés, il peut être nécessaire de partir d'un dérivé activé du sucre, par exemple l'halogénose peracétylé **3.7**. On observe de la même façon la formation du dérivé *trans*-1,2 lorsqu'il y a un groupement participant sur la position 2 du sucre. Nous détaillerons à titre d'exemple la préparation du composé **3.42** que l'on trouve au point d'ancrage de la chaîne oligosaccharidique sur la chaîne polypeptidique dans les glycoprotéines^{[25] [26]} (voir le chapitre 13). L'azote de la fonction amide serait sans doute trop peu nucléophile pour qu'on puisse envisager une condensation directe sur le sucre libre. A partir de l'halogénose peracétylé **3.43** dérivé de la *N*-acétylglucosamine, la substitution par l'azoture de tétrabutylammonium donne l'azoture équatorial **3.44**, réduit en amine **3.45** par hydrogénation catalytique sur du platine. On condense l'amine **3.45** avec le carboxyle libre de l'aspartate partiellement protégé **3.46** au moyen de *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide. La synthèse se termine par hydrolyse alcaline des fonctions esters et la libération de la fonction α -amino de la partie aspartate par hydrogénation catalytique.



Propriétés des glycosylamines

Il y a mutarotation en solution. La figure 3.6 donne un mécanisme possible. La protonation de l'oxygène cyclique est suivie de l'ouverture du cycle, qui donne un intermédiaire où le carbone anomérique a perdu sa chiralité. Le même intermé-

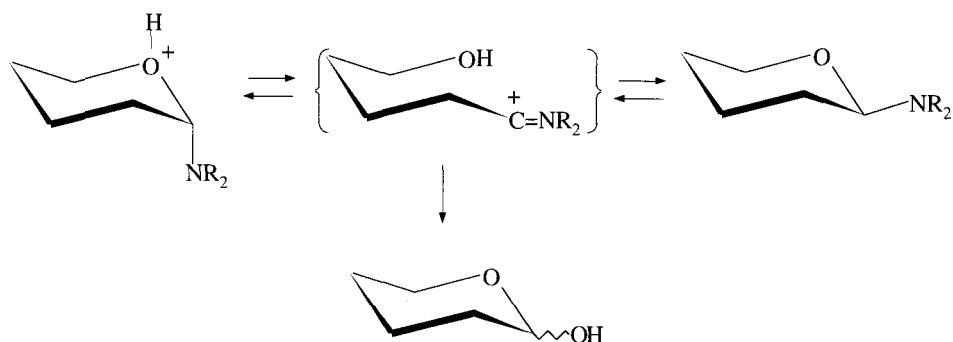
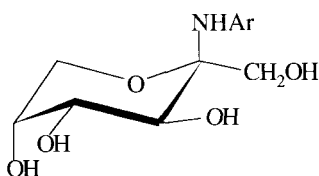


Figure 3.6 Mécanisme proposé pour l'hydrolyse d'une glycosylamine.

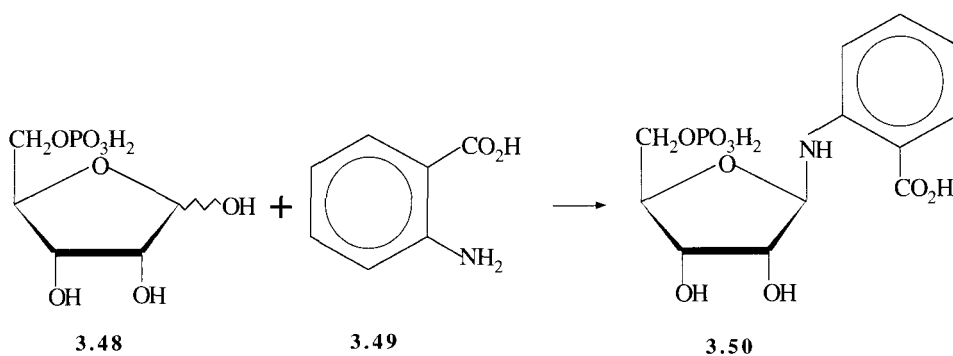
diaire peut évoluer vers la formation du produit d'hydrolyse, qui est très rapide avec les glycosylamines, sauf aux pH extrêmes supérieurs à 9, ou inférieurs à 1,5. En milieu très acide, la protonation de l'azote introduit une charge positive qui s'oppose à celle de l'oxygène. Par exemple, la β -D-glucosylpipéridine est stable 17 h à 0° dans HCl 2N. La vitesse d'hydrolyse est maximum au voisinage de pH 5. Les arylglycosylamines sont plus résistantes.

Les *N*-glycosylamines se réarrangent au chauffage en présence de traces d'acides en dérivés arylaminés de cétose. Par exemple la glucosylamine **3.41** donne le fructose aminé **3.47**. En fait, la réaction se produit avec les glycosylamines les plus variées, dérivées d'amines aliphatiques, d'acides aminés, etc., avec quelques variations dans les procédés. Elle est connue sous le nom de réarrangement d'Amadori. La biosynthèse de l'indole dans les entérobactéries fait intervenir un tel réarrangement, dont chaque étape est catalysée enzymatiquement. Un dérivé activé du phosphate du ribose **3.48** se condense à l'acide anthranilique **3.49**, donnant une *N*-aryl ribosylamine **3.50**. Le réarrangement de **3.50** conduit à **3.51** qui a un carbonyle libre. L'attaque électrophile sur le carbone *ipso* du carboxyle, suivie de déshydratations, donne le cycle indole lié à un triol phosphate, **3.52**. Celui-ci se détache ensuite par rupture rétroaldolique.

Un autre réarrangement remarquable dans cette série est le réarrangement de Heyns. Les cétosylamines se transforment en 2-amino-2-déoxyaldoses d'une manière stéréospécifique. Le fructose dans l'ammoniac alcoolique donne une fructosylamine **3.53** qui se transforme spontanément en 2-amino-2-déoxy-D-glucose **3.55**. On observe la même réaction spontanée avec d'autres fructosylamines substituées à l'azote, par exemple **3.54** donne **3.56**. Parfois il faut une catalyse



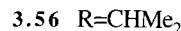
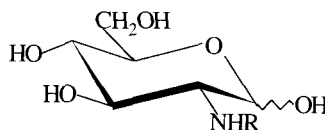
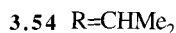
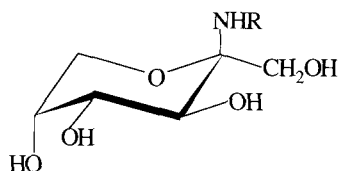
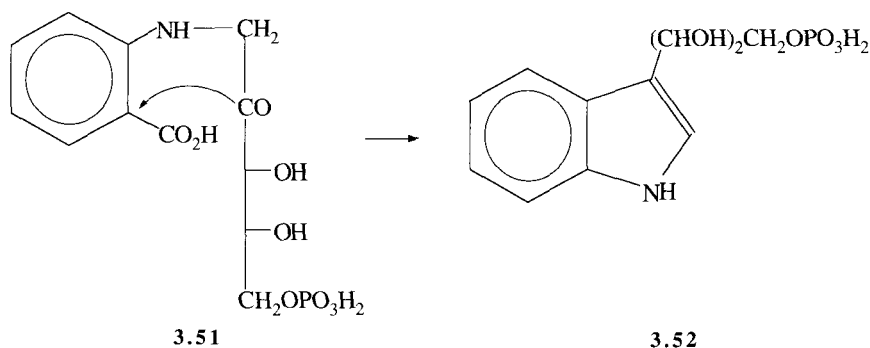
3.47



3.48

3.49

3.50

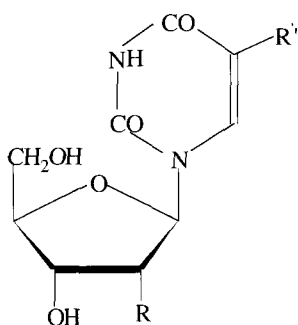


acide. C'est au moyen de ce réarrangement que les cellules fabriquent le sucre aminé 2-amino-2-déoxy-D-glucose, fondamental dans leur économie, à partir du fructosyl-phosphate. Le donneur du groupement NH₂ est l'acide aminé glutamine. Nous avons déjà signalé cette biosynthèse, qui explique l'appartenance de la *N*-acétyl-glucosamine à la série D des sucres, au chapitre 1, paragraphe 1.2.

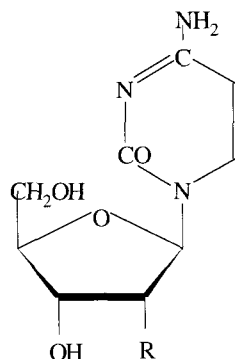
3.6.3 Nucléosides^[27]

Dans ces aminoglycosides, l'azote fait partie d'un hétérocycle et le sucre est le D-ribose, ou son dérivé désoxygéné en 2, le « désoxyribose », dont le nom correct est 2-désoxy-D-érythro-pentose, tous les deux à l'état de furanose. Les ribosides, liés par des fonctions phosphodiester entre les fonctions alcool 3 et 5, forment l'acide ribonucléique (ARN), et les désoxyribosides forment de la même façon l'ADN. L'élucidation progressive du rôle de ces deux molécules en génétique est sans doute la découverte la plus importante de la seconde moitié du XX^e siècle, et l'auteur pense qu'aucune personne cultivée n'a le droit d'ignorer les formules 3.57, 3.58, 3.59 et 3.60, d'une part, et 3.61, 3.62, 3.63 et 3.64, d'autre part, quelle que soit sa formation par ailleurs. La chimie de l'ADN et de l'ARN ne fait pas partie du cadre de cet ouvrage, seul l'aspect aminoglycoside sera traité. Donc la longueur de ce paragraphe est sans commune mesure avec l'importance de ces molécules.

On trouve en plus dans les acides nucléiques, en particulier dans l'acide ribonucléique de transfert (t-RNA), une cinquantaine de nucléosides modifiés, en

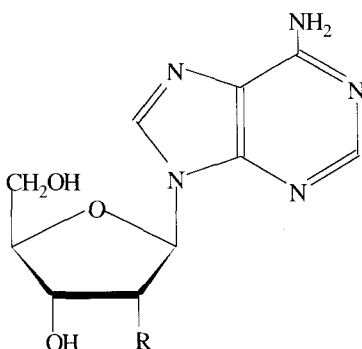


3.57 R=OH, R'=H

3.58 R=H, R'=CH₃

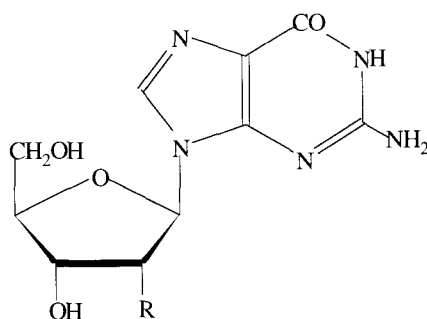
3.59 R=OH

3.60 R=H



3.61 R=OH

3.62 R=H

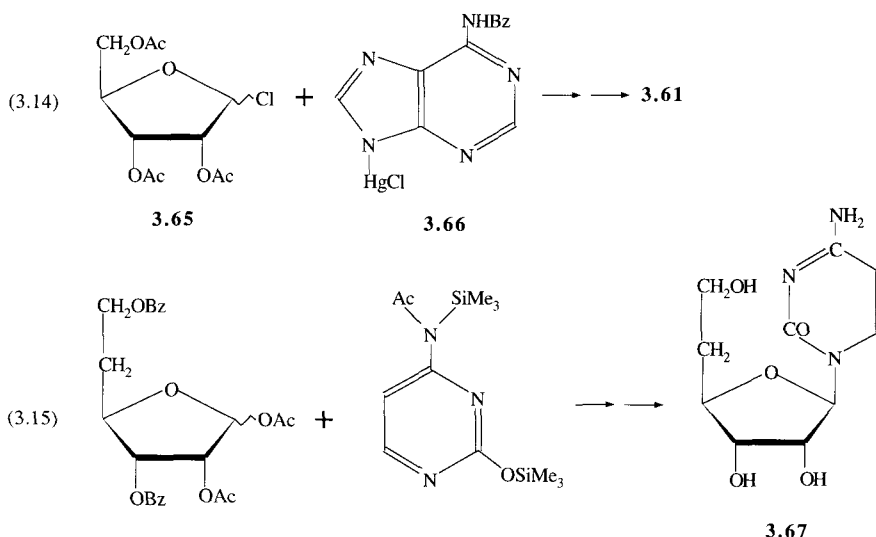


3.63 R=OH

3.64 R=H

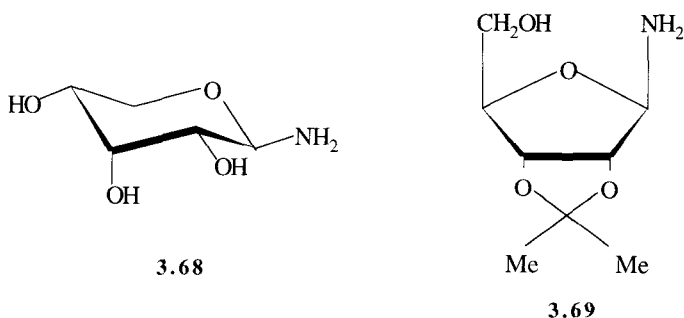
général assez voisins des types fondamentaux. Enfin, on trouve à l'état naturel un très grand nombre de nucléosides, comportant des bases hétérocycliques variées, et des sucres variés, souvent doués de propriétés thérapeutiques plus ou moins grandes. Comme les produits de cette dernière catégorie ne sont pas des constituants universels de la cellule vivante, ils sont également en dehors du cadre de ce livre.

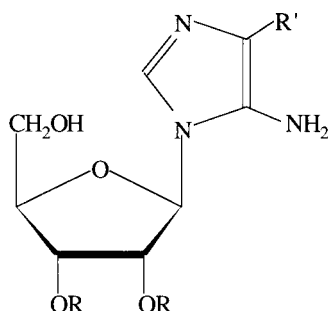
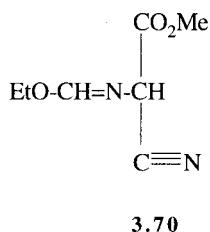
Les nucléosides fondamentaux sont facilement préparés par hydrolyse chimique ou enzymatique, à partir de sources abondantes comme l'ARN de la levure et l'ADN de la laitance de poisson et sont commercialement disponibles. Les synthèses que nous allons donner ne se justifient donc que dans leur extension à la préparation de nucléosides modifiés, ou marqués isotopiquement. On obtient l'adénosine par condensation du chlorure de ribofuranosyle activé **3.65** avec le dérivé chloromercuriel de la 6-benzamidopurine **3.66**, suivie de débenzoylation. (Réaction (3.14)).



On prépare souvent les nucléosides pyrimidiques par la méthode de Vorbrüggen^[28]. Le dérivé silylé de la base est condensé avec le peracétate du sucre à froid en présence de SnCl_4 . La réaction (3.15) donne la préparation d'une homocytidine **3.67** par cette méthode^[29]. Vorbrüggen a introduit d'autres catalyseurs plus récemment. On remarquera que l'on obtient uniquement, avec un excellent rendement, le dérivé β -*trans*-1,2. Ceci est une conséquence, une fois de plus, de la présence d'un groupement participant en C(2). Aussi, lorsqu'on applique ces méthodes à la préparation des désoxyribonucléosides obtient-on en général un mélange de nucléosides α et β .

Pour d'autres composés, on a trouvé avantageux de construire l'hétérocycle sur l'azote de la ribosylamine. Le traitement du ribose par l'ammoniac donne la ribopyranosylamine **3.68** qui subit une régression de cycle lors de la cétalisation avec l'acétone ; on obtient **3.69**. La condensation de **3.69** avec le dérivé **3.70** du cyanoacétate de méthyle donne le β -ribosylimidazole **3.71**. Désacétalation et décar-





3.71 $\text{R}, \text{R}=\text{CMe}_2$ $\text{R}'=\text{CO}_2\text{Me}$

3.72 $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$

boxylation de **3.71** conduisent au nucléoside **3.72** dont le phosphate est le précurseur naturel des nucléosides dérivés de l'adénine^[30] et de la pyrimidine de la thiamine^[31].

RÉFÉRENCES

- [1] R. J. Ferrier et P. M. Collins, *Monosaccharide Chemistry*, (chapitre 3) Penguin Books, Harmondsworth, 1972.
- [2] W. G. Overend, « Glycosides », dans *The Carbohydrate*, sous la direction de W. Pigman et D. Horton, (vol. 1A, chapitre 9) Academic Press, New York, 2^e éd., 1972.
- [3] R. J. Ferrier, « The Reaction and Synthesis of Monosaccharide Derivatives » dans *Carbohydrate Chemistry*, sous la direction de J.F. Kennedy, (chapitre 11) Clarendon Press, Oxford, 1988.
- [4] J. W. Green, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 21 (1966) 95-142. En ce qui concerne les mécanismes donnés dans ces ouvrages [1], [2], [3] et [4], le lecteur se rappellera que, si les faits demeurent, leur interprétation évolue vite.
- [5] G. N. Bollenback, *Methods Carbohydr. Chemistry* II, 326-328.
- [6] I. Augestad et E. Berner, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 251-256.
- [7] A. Lubineau et J. C. Fischer, *Synthetic Communications*, 1991 (21) 815-818.
- [8] S. Angyal, M. E. Evans et R. J. Beveridge, *Methods Carbohydr. Chem.*, VIII (1980) 233-235
- [9] S. Hannessian et J. Banoub, *Methods Carbohydr. Chem.*, VIII (1980) 243-245.
- [10] H. S. Isbell et H. L. Frush, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 24 (1940) 125-151.
- [11] S. J. Angyal et K. Dawes, *Aust. J. Chem.*, 21 (1968) 2747-2760.
- [12] G. H. Coleman, *Methods Carbohydr. Chem.*, II (1963) 397-399.
- [13] R. H. Halcomb et S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 6661-6666.
- [14] R. U. Lemieux et G. J. Huber, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 4117-4119.
- [15] K. Brimer et A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 72 (1989) 1371-1382.

- [16] A. F. Bochkov et G. E. Zaikov, *The Chemistry of the O-Glycosidic Bond*, Pergamon Press, Oxford, 1979.
- [17] J. N. Bemiller, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 22 (1967) 25-108.
- [18] J. Szejtli, *Säurehydrolyse glykosidischer Bindungen*, Akadémiai Kladó, Budapest, 1976.
- [19] J. T. Edward, *Chem. Ind. London* (1955) 1102.
- [20] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.*, 90 (1990) 1171-1202.
- [21] C. D. Ritchie, *Physical Organic Chemistry*, Editions Marcel Dekker, New York, 1990.
- [22] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40 (1982) 131-234.
- [23] G. Legler, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 48 (1990) 319-384.
- [24] H. Paulsen et K.W. Pflughaupt, *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, sous la direction de W. Pigman et D. Horton (vol. 1B p. 881), Academic Press, New York, 2^e éd., 1980.
- [25] H. G. Garg et R.W. Jeanloz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 43 (1985) 135-201.
- [26] C. Augé, C. Gautheron et H. Pora, *Carbohydr. Res.*, 193 (1989) 288-293.
- [27] J. A. Secrist III, *Carbohydrate Chemistry*, sous la direction de J.F. Kennedy (chapitre 11) Clarendon Press, Oxford, 1988.
- [28] U. Niedballa et H. Vorbrüggen, *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, 9 (1970) 461-462.
- [29] S. David et G. de Sennyey, *Carbohydr. Res.*, 77 (1979) 79-97.
- [30] N. J. Cusack, B. J. Hildick, D. H. Robinson, P. W. Rugg et G. Shaw, *J. Chem. Soc., Perkin I* (1973) 1720-1731.
- [31] B. Estramareix et S. David, *Biachim. Biophys. Acta*, 1035 (1990) 154-160.

Nomenclature

4.1 INTRODUCTION

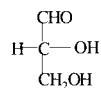
Nous avons différé jusqu'ici l'exposé de la nomenclature des sucres en raison de la sécheresse du sujet. Nous espérons avoir suffisamment intéressé le lecteur dans les trois premiers chapitres pour qu'il se sente le courage d'aborder celui-ci. De cette nomenclature, nous ne donnerons que les règles utiles dans cet ouvrage. Leur connaissance permet d'aborder la littérature originale et leur extrapolation à des situations non envisagées ici est possible avec un minimum de sens de la généralisation. Ces règles sont extrêmement commodées. Les noms correspondants sont utilisés (à de minimes détails près) dans les tables par composés chimiques (*Chemical Substances Index*) de *Chemical Abstracts*. Ce sont également les noms que l'on doit employer dans les parties expérimentales des mémoires, en tête des paragraphes qui décrivent des préparations.

4.2 NOMENCLATURE DES ALDOSES

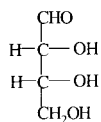
4.2.1 Noms courants des sucres et symboles de configuration

Les noms fondamentaux des aldoses, avec une chaîne à 3-10 carbones et au-delà, sont : triose, tétrorse, pentose, hexose, heptose, octose, nonose, décose, etc. On numérote la chaîne à partir du carbone porteur de la fonction aldéhyde, réelle ou potentielle. A ces noms, il faut ajouter un symbole qui décrit la configuration des hydroxyles. Ces symboles dérivent des noms communs des sucres. Le tableau 4.1 donne la configuration et le nom commun des sucres de la série droite, de C_3 à C_6 . Les sucres sont dessinés selon la projection de Fischer. C'est toujours à ce mode de représentation qu'il faut revenir pour trouver le nom systématique d'un dérivé de sucre.

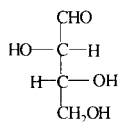
Ce tableau doit être complété par le tableau de la série gauche, dont les éléments sont deux à deux symétriques de ceux du tableau 4.1. Les définitions des séries droite et gauche ont été données dès le chapitre 1. Rappelons que la série droite est définie par l'orientation à droite de l'hydroxyle alcoolique secondaire de rang le plus élevé. On omet parfois le descripteur de série pour glucose, galacto-



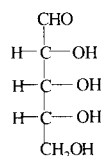
D-glycéraldéhyde



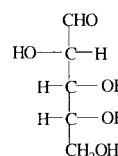
D-érythrose



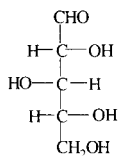
D-thréose



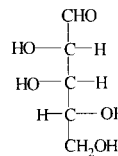
D-ribose



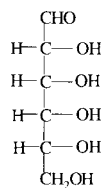
D-arabinose



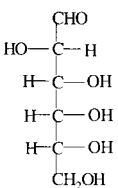
D-xylose



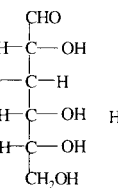
D-lyxose



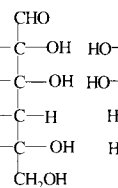
D-allose



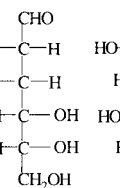
D-altrose



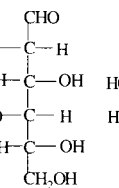
D-glucose



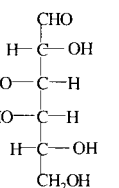
D-gulose



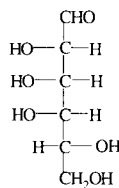
D-mannose



D-idose



D-galactose



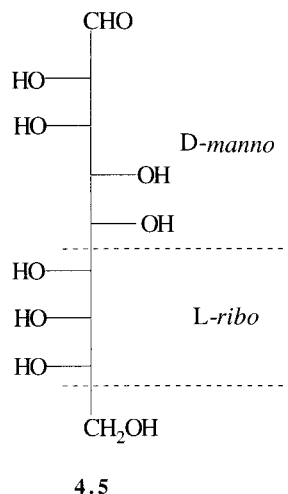
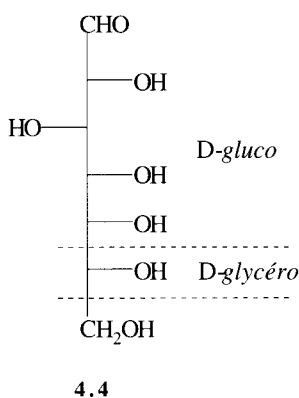
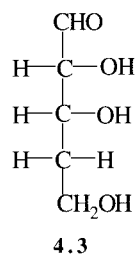
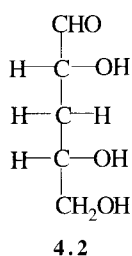
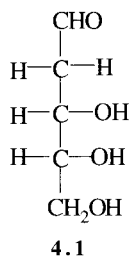
D-talose

Tableau 4.1 Configuration des pentoses et hexoses de la série D.

se, mannose et ribose. Il faut alors comprendre qu'il s'agit de la série droite. Les noms du tableau 4.1 sont des noms courants et recommandés. Ce ne sont pas des noms de nomenclature systématique.

Les sucres du tableau 4.1 se distinguent par le nombre et la position relative des centres chiraux, qui sont des fonctions alcool secondaire vicinales. D'une façon générale, leur noms (modifiés) servent de base à la description de la configuration de centres de chiralité sur une chaîne, *même s'ils ne sont pas contigus*. Sauf dans le cas du D-glycéraldéhyde, qui a donné D-*glycéro*, on a forgé ces symboles de configuration en supprimant la terminaison « se ». Pour éviter toute confusion, on les écrit en italique et sans capitale : D-*érythro*-, D-*ribo*-, L-*galacto*-, etc. Exemples de noms systématiques : D-*ribo*-pentose (ribose), D-*gluco*-hexose (glucose). Le « désoxyribose » **4.1** et ses isomères **4.2.** et **4.3** sont les trois D-*érythro*-pentoses possibles.

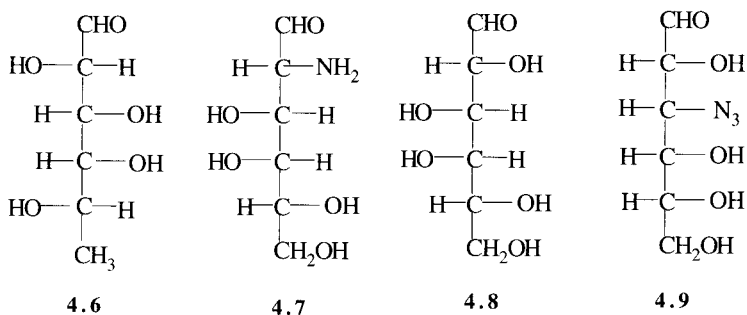
A partir des heptoses, il peut y avoir plus de 4 centres chiraux sur la chaîne. On n'a pas jugé souhaitable de créer de nouveaux noms pour désigner, par exemple, toutes les configurations possibles d'un système de cinq fonctions alcool secon-



daire. On décrit ces configurations par une association de symboles. On part du centre chiral le plus près de la fonction aldéhyde, on regroupe les centres chiraux par groupes de 4, jusqu'à ce qu'il n'en reste plus que 3, 2, ou 1, qui forment un dernier groupe du côté de l'extrémité non réductrice. A chacun de ces groupes, on peut attribuer un symbole de configuration. Dans le nom systématique, on les énumère dans l'ordre à partir de l'extrémité non réductrice : *D-glycéro-D-gluco-heptose*, **4.4.**, *L-ribo-D-manno-nonose*, **4.5.**

4.2.2 Sucres désoxygénés

Le remplacement d'un hydroxyle alcoolique par de l'hydrogène s'indique par le préfixe *déoxy-*, précédé d'un chiffre qui donne la position désoxygénée. Nous pouvons maintenant donner les noms systématiques complets des trois sucres **4.1**, **4.2** et **4.3**, c'est-à-dire : 2-déoxy-D-érythro-pentose, 3-déoxy-D-érythro-pentose et 4-déoxy-D-érythro-pentose. Un souci présent dans cette nomenclature est de ne pas introduire de terme qui suggère la présence de plus de centres chiraux qu'il n'y en a réellement. Ainsi le nom courant « désoxyribose » a une connotation



incorrecte, parce que ce sucre n'a que deux carbones asymétriques alors que la racine « ribo » suggère la présence de la configuration du ribose, avec trois carbones asymétriques. En bref, ne pas introduire de centre chiral à une extrémité du nom systématique pour l'effacer à l'autre extrémité.

La désoxygénation de la fonction alcool primaire ne supprime pas de centre chiral. Par exemple, la variété naturelle la plus abondante du fucose, le L-fucose, **4.6**, a comme nom systématique 6-déoxy-L-*galacto*-hexose.

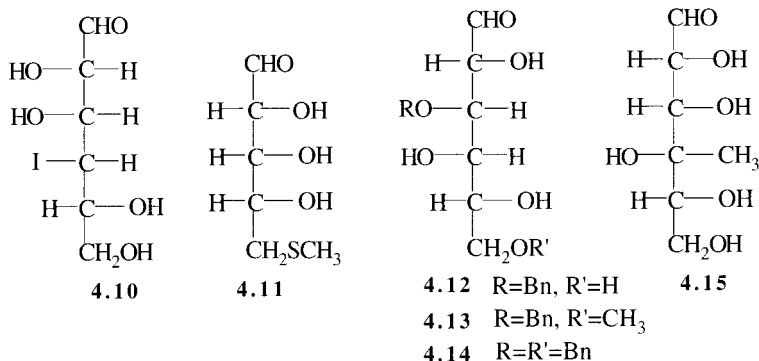
4.2.3 Sucres substitués par NRR', F, Cl, Br, I, N₃, alkyl-S et phényl-S

On remplace d'abord le groupement non oxygéné par un hydroxyle, ce qui donne la configuration de base. Ainsi celle du dérivé aminé **4.7** est celle du D-*galacto*-hexose, **4.8**. La filiation entre **4.8** et **4.7** s'indique avec deux préfixes : l'un d'eux est désoxy-, introduit au paragraphe précédent, et l'autre précise la nature du substituant. Les descripteurs les plus courants sont amino, acétamido, fluoro, chloro, bromo, iodo, azido, alkylthio, phénylthio. L'emplacement est donné par un chiffre qui précède chaque préfixe. Exemple pour **4.7** : 2-amino-2-déoxy-D-*galacto*-hexose. On admet les noms de galactosamine, glucosamine et mannosamine pour les 2-amino-2-déoxy-D-*galacto*-, D-*gluco*- et D-*manno*-hexoses.

Le même principe permet de désigner **4.9** comme le 3-azido-3-déoxy-D-*allo*-hexose, **4.10** comme le 4-déoxy-4-iodo-D-*talo*-hexose, **4.11** comme le 5-déoxy-5-méthylthio-D-*ribo*-pentose. Les préfixes doivent se succéder dans l'ordre alphabétique, avant les descripteurs de configuration.

4.2.4 Dérivés substitués sur l'oxygène

On indique cette substitution par un *O* majuscule en italique, suivi d'un tiret puis du nom du substituant, et précédé d'un chiffre qui indique la position de l'oxygène substitué sur la chaîne. On ne répète pas les substituants identiques. Exemples : 3-*O*-benzyl-D-*galacto*-hexose **4.12**, 3-*O*-benzyl-6-*O*-méthyl-D-*galacto*-hexose **4.13**, 3,6-di-*O*-benzyl-D-*galacto*-hexose **4.14**. Dans ces dérivés directs d'un sucre du tableau 4.1 (ou d'un sucre symétrique), on simplifie les noms en 3-*O*-benzyl-D-galactose, 3,6-di-*O*-benzyl-D-galactose, etc.



La substitution sur le carbone s'indique de même avec un *C* majuscule en italique. Exemple : 4-*C*-méthyl-D-*gulo*-hexose, **4.15**.

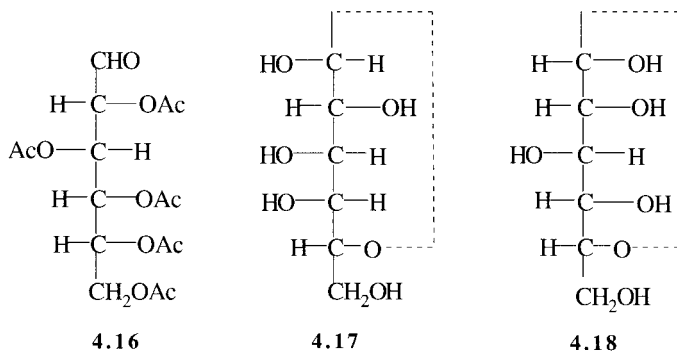
4.2.5 Formes acycliques

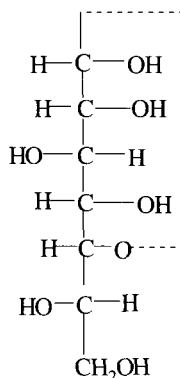
En raison du caractère exceptionnel des formes acycliques, certains auteurs préfèrent insister sur cette particularité. Le composé **4.16** s'appellera 2, 3, 4, 5, 6-penta-*O*-acétyl-aldéhydo-D-*gluco*-hexose, plus brièvement *aldéhydo*-D-glucose pentaacétate.

On notera que le préfixe *aldéhydo* n'ajoute rien au premier nom, mais qu'il est indispensable au second.

4.2.6 Formes cycliques

On indique la dimension du cycle en remplaçant la terminaison « se » du nom du sucre par « furanose » pour un cycle à 5 éléments, « pyranose » pour un cycle à 6 éléments et « septanose » pour un cycle à sept éléments. Comme nous l'avons déjà vu, l'hydroxyle hémiacétalique s'appelle anomérique. L'anomère α est celui qui en projection Fischer se trouve du même côté que l'oxygène lié au carbone asymétrique dont la configuration définit la série. Le symbole de configuration ano-



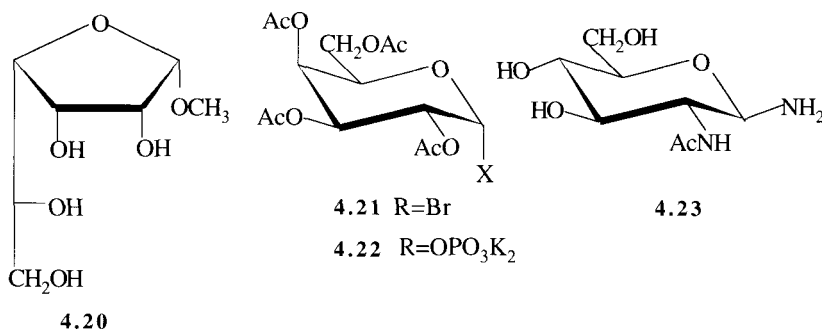


4.19

mérique, α ou β , est placé avant le symbole de série. Exemples : β -D-galactopyranose, **4.17**, α -D-glucopyranose, **4.18**, L-glycéro- β -D-glucopyranose, **4.19**.

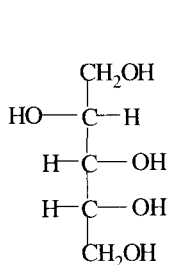
On forge le nom des glycosides (voir le chapitre 3) en remplaçant la terminaison « se » de la forme cyclique par « ide ». Le nom du groupe qui substitue l'hydrogène hémiacétalique est mis en avant, comme un mot séparé. Exemple : méthyl α -D-gulofuranoside, **4.20**.

Le radical formé par détachement de l'hydroxyle anomérique est désigné en remplaçant la lettre terminale « e » par « yle ». Exemples : bromure, **4.21** ou phosphate dipotassique, **4.22** de tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle. Dans le cas du remplacement par un groupe amino, on ajoute la terminaison amine : 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranosylamine, **4.23**.

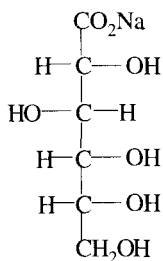


4.2.7 Alditols

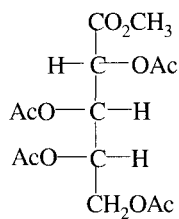
Ils dérivent du nom du sucre parent par le remplacement de « ose » par « itol ». Le même alditol peut dériver de plusieurs sucres parents. Ainsi le D-arabinitol **4.24**, nommé comme un dérivé du D-arabinose, est aussi accessible par réduction du D-lyxose et pourrait être appelé D-lyxitol. Diverses règles, que nous ne donnerons pas ici, permettent de sélectionner un nom unique.



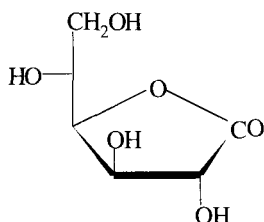
4.24



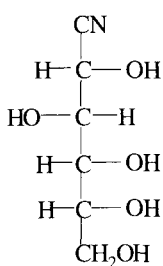
4.25



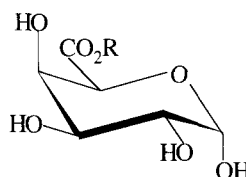
4.26



4.27



4.28



4.29 R=H

4.30 R=CH₃

4.2.8 Acides aldoniques

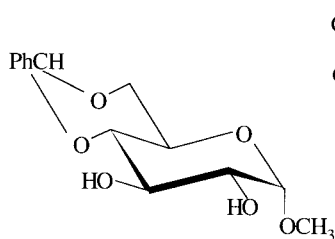
Ce sont les acides carboxyliques qui résultent de l'oxydation de la fonction aldéhyde. On les nomme en remplaçant « ose » par « onique ». Les sels, esters, halogénures, amides et nitriles sont désignés suivant les règles habituelles de la nomenclature organique. Exemples : D-gluconate de sodium, **4.25**, tétra-*O*-acétyl-L-arabinonate de méthyle, **4.26**, D-glucono-1,4-lactone, **4.27**, D-glucononitrile, **4.28**.

4.2.9 Acides uroniques

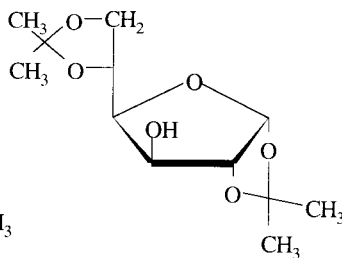
On appelle ainsi les acides monocarboxyliques résultant de l'oxydation de la fonction alcool primaire des aldoses. On les désigne en remplaçant la terminaison « ose » du nom courant ou systématique par « uronique » et la terminaison « oside » d'un glycoside par « osiduronique ». Exemples : acide α -D-galacturonique, **4.29**, α -D-galactopyranuronate de méthyle, **4.30**.

4.2.10 Acétals cycliques

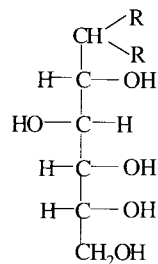
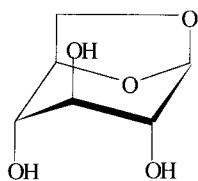
On les écrit par extension des règles applicables aux dérivés d'alcools, avec comme préfixe, des noms de radicaux divalents tels qu'il existent dans la nomen-



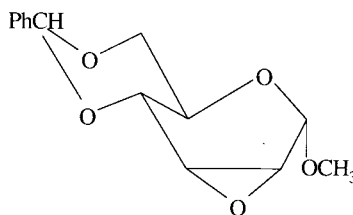
4.31



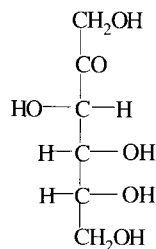
4.32

4.33 R=OCH₃4.34 R=SCH₃

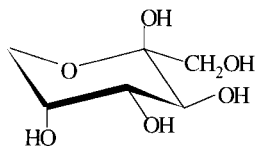
4.35



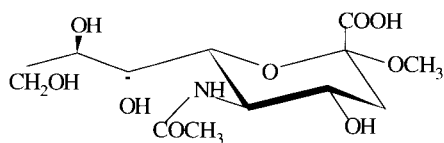
4.36



4.37



4.38



4.39

clature générale. Exemples : méthyl 4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyranoside, **4.31**, 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-glucopyranoside, **4.32**.

4.2.11 Acétals et thioacétals

On emploie les mots acétal et thioacétal à la suite du nom du sucre générateur. Exemples : D-glucose diméthyl acétal, **4.33**, D-glucose diméthyl dithioacétal, **4.34**.

4.2.12 Anhydrides intramoléculaires

On fait précéder le nom du sucre du préfixe « anhydro » suivi d'un tiret. Ce préfixe est précédé de deux chiffres qui indiquent le rang des carbones pontés. Exemple : 1,6-anhydro- β -D-glucopyranose, **4.35**.

Les oxiranes dérivés de sucres rentrent dans cette catégorie. Remarquez que **4.36**, méthyl 2,3-anhydro-4,6-*O*-benzylidène- α -D-allopyranoside, est nommé comme un dérivé *allo*. Dans le D-allose de base, chacun des hydroxyles portés par les carbones 2 et 3 a la même position que le pont oxygène de **4.36** par rapport au cycle pyranose.

4.3 CÉTOSES

On les classe comme 2-cétooses, 3-cétooses, etc., selon la position du carbonyle dans la chaîne. On peut supprimer 2 pour les 2-cétooses, variété naturelle commune. On remplace la terminaison « ose » du nom de base par « ulose ». Ainsi le fructose est un 2-hexulose, ou, plus simplement, un hexulose. Pour le nom complet, on le fait précéder du préfixe de configuration. Le nom systématique du fructose **4.37** sera *D-arabino*-2-hexulose. Dans le cas des 2-cétooses, il n'y a pas d'ambiguïté possible sur la configuration des pyranoses et furanoses. La nomenclature est calquée sur celle des aldoses. Exemple : β -D-fructopyranose **4.38**. Le méthyl glycoside **4.39** de l'acide sialique se dénomme : acide méthyl 5-acétamido-3,5-didéoxy-D-*glycero*- α -D-*galacto*-2-nonulopyranosidonique.

Réactions des hydroxyles

5.1 DÉRIVÉS FONCTIONNELS

5.1.1 Importance des réactions de protection

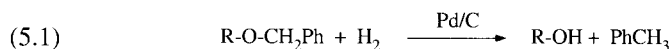
Dans la majorité des sucres, tous les carbones sont fonctionnels. Si l'on veut faire réagir une fonction particulière avec les procédés habituels de la chimie organique, il faut « protéger » les autres fonctions. Ceci veut dire les transformer en dérivés inertes dans les conditions de la réaction envisagée, mais néanmoins reconvertibles en fonction de départ à une étape ultérieure. Nous appellerons cette dernière phase « déprotection ». Il est souvent utile de protéger les diverses fonctions d'une même molécule par des dérivations de nature différente, de façon à pouvoir effectuer des déprotections sélectives. Nous avons déjà rencontré la protection la plus universelle de l'hydroxyle hémiacétalique, qui est la glycosidation (voir le chapitre 3). Il n'y aura pas que des réactions de protection dans ce paragraphe. Certains dérivés fonctionnels ont un rôle analytique et les phosphates et sulfates sont des produits naturels universellement répandus qu'il est utile de savoir préparer par synthèse. On traitera les sulfonates au paragraphe 6.1, en introduction aux réactions d'inversion de configuration.

5.1.2 Éthers

On les prépare communément par action des halogénures et des sulfates sur les alcoolates. Ces conditions basiques détruiraient les sucres libres, qu'il faut d'abord transformer en glycosides. Les éthers méthyliques ne servent que pour les applications analytiques et les déterminations de structure. On met ainsi à profit leur grande stabilité. On trouvera leur préparation pour ces applications au paragraphe 9.4.3.

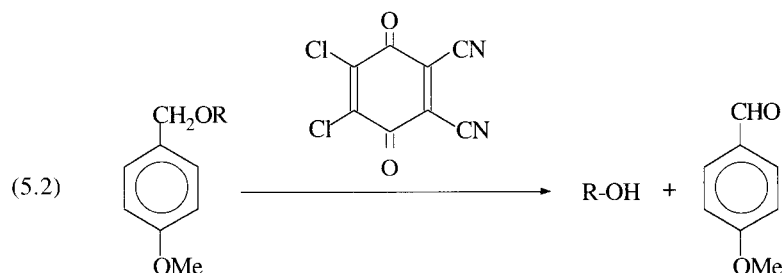
Les éthers benzyles sont très employés. Nous avons déjà rencontré un exemple d'utilisation au paragraphe 3.5.3, où est décrite la synthèse du méthyl tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranoside, **3.36**. On pratique le plus souvent la benzylation en milieu alcalin. On peut employer comme solvant l'oxolane, mais la réaction est beaucoup plus rapide dans la *N,N*-diméthylformamide (DMF), qui par ailleurs est un meilleur solvant des sucres peu protégés. Comme base, on a utilisé KOH, mais

on préfère maintenant préformer l'alcoolate avec NaH en très léger excès. Le réactif alkylant est le bromure de benzyle. Les éthers benzyliques sont stables dans les conditions acides modérées et en milieu alcalin. D'une façon générale, les éthers benzyliques sont coupés par hydrogénation catalytique suivant l'équation (5.1).

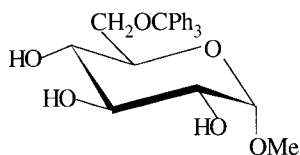


La déprotection a lieu par hydrogénation catalytique en présence de palladium sous une pression d'hydrogène de quelques atmosphères. Ceci restitue les fonctions hydroxylées et le toluène est facilement séparable. L'hydrogénolyse par transfert ne demande aucun équipement spécialisé. On fait bouillir à reflux une solution alcoolique du sucre protégé en présence de palladium sur charbon, avec, comme donneur d'hydrogène, le cyclohexène ou le cyclohexadiène qui s'aromatisent dans la réaction.

On prépare les éthers paraméthoxybenzyliques comme les éthers benzyliques. Ils sont coupés par oxydation par la 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) ou le nitrate cérique ammoniacal, $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_2)_6$ (Réaction (5.2)). Le moteur de la réaction est l'oxydation de la position benzylique du groupement protecteur, grandement facilitée par le méthoxy en *para*.



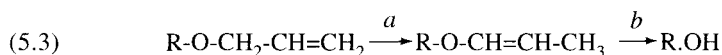
Le chlorotriphénylméthane, Ph_3CCl , réagit dans des conditions plus modérées sur le sucre dissous dans la pyridine. A froid, si on ne prolonge pas indument la durée du traitement, seule la fonction alcool primaire est étherifiée. Par exemple, on obtient l'éther **5.1** avec le méthyl α -D-glucopyranoside. Ces éthers sont hydrolysés dans des conditions acides très modérées, par exemple dans l'acide acétique aqueux à 80°C. Il y a un risque d'hydrolyse, également, lorsqu'on les chromato-



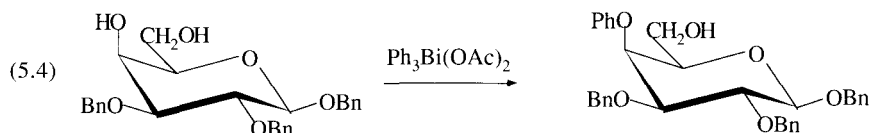
5.1

graphie sur gel de silice ; enfin, ils sont coupés par hydrogénolyse dans les mêmes conditions que les éthers benzyliques.

On prépare les éthers allyliques^[1] comme les éthers benzyliques, avec du bromure d'allyle. La déprotection s'effectue en deux temps : a) isomérisation en éther propénylique par chauffage en présence d'une base forte (Me_3COK) ou d'un catalyseur complexe de métal de transition ; b) rupture par traitement de l'éther propénylique par un sel mercurique (Réactions (5.3)). On voit qu'on peut déprotéger un hydroxyle transformé en éther allylique sans toucher à des protections benzyliques sur la même molécule. L'inverse n'est pas vrai : en présence de palladium, un éther allylique est partiellement hydrogénolysé, partiellement réduit en éther propylique, qui est un cul-de-sac synthétique.



On obtient les éthers phényliques en traitant les diols par le diacétoxytriphenylbismuth dans le dichlorométhane bouillant^[2]. La réaction (5.4) donne un exemple de cette transformation dont le mécanisme n'est pas connu.



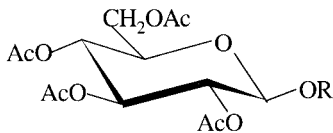
5.1.3 Dérivés silylés

Les « éthers » triméthylsilylés sont trop labiles pour assurer une protection des hydroxyles. On a décrit leur synthèse et leurs applications analytiques au chapitre 1. En synthèse, on leur préfère les éthers *ter*-butyldiméthylsilylés, obtenus avec le *ter*-butylchlorodiméthylsilane $\text{Me}_3\text{CSiMe}_2\text{Cl}$, par réaction dans la pyridine en présence d'imidazole. Leur stabilité n'est cependant pas parfaite. On gagne encore en stabilité en convertissant les alcools en dérivés *ter*-butyldiphénylsilylés, obtenus avec le *ter*-butylchlorodiphénylsilane^[3]. L'éthérification a lieu à température modérée dans la DMF, en présence d'imidazole. Cette dernière protection résiste à l'hydrogénolyse catalytique et aux conditions d'hydrolyse des acétals. Tous les éthers silylés sont hydrolysés en présence de fluorures. Ces sels ont des réactions légèrement alcalines, ce qui peut amener des migrations de groupement acétyle.

5.1.4 Esters d'acides organiques et carbonates

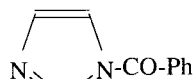
Sur les glycosides, on pratique acétylation et benzoxylation selon les techniques traditionnelles, avec les réactifs $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_3COCl , PhCOCl , et une base, pyridine ou triéthylamine. Les nouveautés apparaissent dans l'acylation des sucres libres. Il se forme toujours essentiellement des peracétates pyranosiques et on a trouvé des conditions permettant d'orienter vers la production de l'un ou de

l'autre anomère. Ainsi, en présence de ZnCl_2 , ou d'autres catalyseurs acides, dans des conditions anomérisantes, on obtient l'anomère le plus stable, à groupement acyl axial, tel le penta-*O*-acétyl- α -D-glycopyranose. Ce n'est malheureusement pas l'anomère le plus intéressant en synthèse en raison de sa faible réactivité. On évite largement sa formation en opérant dans l'anhydride acétique à 100° , avec l'acétate de sodium comme base, conditions qui permettent de préparer l'anomère équatorial **5.2**.



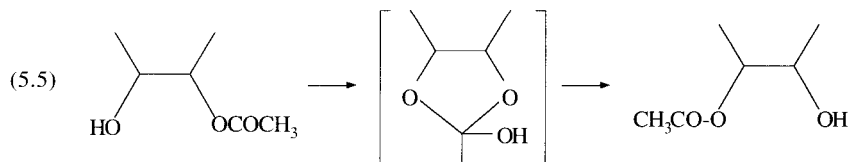
5.2 R=Ac

5.3 R=H



5.4

On déprotège les glycosides acétylés par méthanolyse alcaline, en les traitant à froid par du méthanol qui contient environ 1 % de CH_3ONa . Les groupements acétyl, transférés sur le solvant, donnent l'acétate de méthyle volatil. On ne peut désacétyler l'oxygène anomérique de cette façon, car la fonction hémiacétal produite serait rapidement décomposée dans le milieu alcalin. Les groupements acétyl sont stables dans les conditions neutres ou acides modérées, et ont effectivement été employés comme protections dans certaines synthèses d'oligosaccharides. Cependant, la sécurité n'est pas totale, car, dans les produits partiellement acétylés, il peut y avoir des migrations, probablement par des intermédiaires cycliques, selon le schéma réactionnel (5.5).



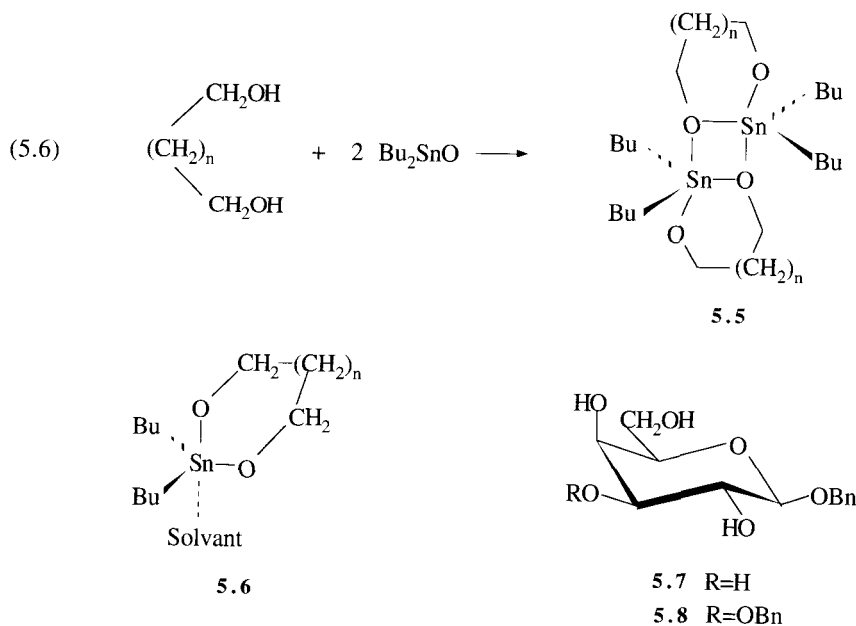
Pour la préparation des trichloracétimides, utilisés en couplage osidique (voir le paragraphe 10.3.2), il faut pouvoir désacétyler sélectivement la position anomérique. On y arrive, à partir de l'anomère β , en le traitant par l'acétate d'hydrazine^[4]. Ainsi on peut préparer **5.3** à partir de **5.2** par cette méthode.

5.1.5 Éthérification et acylation sélectives. Dérivés organostanniques

Nous avons déjà rencontré des dérivations sélectives, par exemple avec le chlorotriphénylméthane et le *ter*-butylchlorodiphénylsilane, qui éthérifient sélectivement les fonctions alcool primaire. Le chlorure de pivalyle Me_3CCOCl manifeste aussi une préférence pour cette position. On peut observer des réactions sélectives avec le réactif benzoylant atténué *N*-benzoylimidazole **5.4**. Lorsqu'il s'agit de dis-

tinguer entre des positions secondaires, on peut avoir avantage à passer par des intermédiaires qui se présentent *formellement* comme des alcoolates du cation dibutylétain, $\text{Bu}_2\text{Sn}^{++}$.

Le réactif est l'oxyde polymère $(\text{Bu}_2\text{SnO})_n$, une poudre insoluble. Lorsqu'on chauffe un glycol en solution benzénique bouillante avec cette poudre, en éliminant l'eau avec un séparateur Dean-Stark, la poudre se dissout et il se forme un complexe pentacoordonné de l'étain, généralement dimère, **5.5** ($n = 0, 1$) selon la réaction (5.6). On peut transférer le produit dans un solvant polaire, où il est alors monomère, avec coordination au solvant, **5.6**. On voit sur cette structure plus simple que, même si le glycol était symétrique, les deux oxygènes se sont différenciés dans le dérivé stannique, l'un étant apical et l'autre équatorial. C'est également vrai dans chacun des monomères associés selon **5.5**, mais il y a là une différenciation supplémentaire puisque l'un des oxygènes est tricoordonné, donc sans pouvoir nucléophile^[5]. Le nom de « stannylène » pour ces produits, généralement utilisé, y compris par l'auteur, n'est pas correct dans le cadre de la nomenclature organométallique, où il désigne un dérivé neutre R-Sn-R .



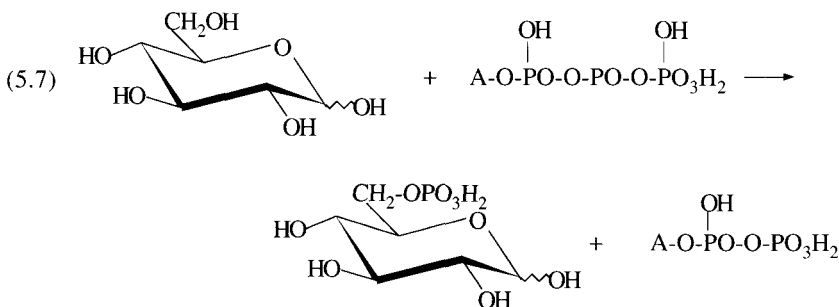
On prépare de la même façon les stannylènes de dérivés de sucres où subsistent deux hydroxyles non protégés et convenablement situés. Les chlorures d'acides réagissent en moins d'une minute à froid sur les stannylènes, en solution benzénique ou dans la DMF, donnant le monoester d'une façon strictement régiosélective. Les halogénures de benzyle et d'allyle conduisent aux éthers correspondants à chaud dans la DMF. Là encore, la réaction est régiosélective.

On n'observe pas de réaction entre les halogénures de benzyle ou d'allyle et les stannylènes, même à chaud dans le benzène, où ces dérivés sont apparemment polymères. Cependant, on peut préparer ces éthers avec de bons rendements dans le benzène au reflux en opérant en présence de quantités catalytiques d'halogénures de tétralkylammonium ; et c'est ainsi qu'on peut observer la plus stricte régiosélectivité dans les cas difficiles. Le benzyl β -D-galactopyranoside **5.7** transformé en stannylène, puis traité par le bromure de benzyle en présence de bromure de tétraméthylammonium dans le benzène bouillant est benzylé exclusivement en 3, pour donner l'éther **5.8** avec 67 % de rendement. On notera la préférence pour l'oxygène en 3 sur les trois autres, dont l'un participe à une fonction alcool primaire. On trouvera au paragraphe 10.1 un exemple de sélectivité encore plus grande.

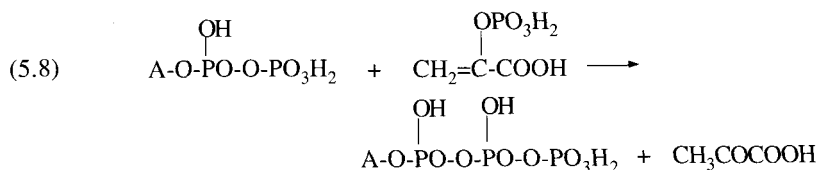
Quelle peut être l'origine de cette sélectivité ? Sur le glycoside **5.7**, il y a au moins trois couples d'hydroxyles capables de former un stannylène. On peut supposer qu'ils se forment tous les trois, mais sont en équilibre et que les enthalpies libres de tous les dimères, ou polymères supérieurs possibles, sont assez différentes pour qu'un seul subsiste pratiquement à la fin. Ceci sélectionne un couple d'hydroxyles et diverses contraintes dues à la nature de la molécule de sucre font que l'un de ces deux hydroxyles préfère la position apicale.

5.1.6 Phosphates

Dans la majorité des cas, la conversion métabolique d'un sucre dans une cellule débute par sa conversion en ester phosphorique. On a d'abord élaboré des synthèses de phosphates de sucres pour les avoir plus commodément à disposition pour les recherches en biochimie. Plus récemment, l'introduction des méthodes enzymatiques en chimie préparative a créé la demande pour des quantités importantes. Ce sont encore précisément des méthodes enzymatiques qui permettent leur préparation à une échelle très élevée. Ainsi le D-glucose 6-phosphate est obtenu par phosphorylation du glucose par un triphosphate, l'adénosine triphosphate (ATP) que nous symboliserons de façon plus explicite par A-O-PO(OH)-O-PO(OH)-O-PO₃H₂, qui transfère son phosphate terminal en présence de l'enzyme hexokinase. L'agent phosphorylant est transformé en adénosine diphosphate ADP, ou A-O-PO(OH)-O-PO₃H₂ (Réaction (5.7)). En raison du prix très élevé



d'ATP, il faut coupler la réaction (5.7) avec un système de régénération, le transfert de phosphate sur ADP à partir du phosphate de l'énol de l'acide pyruvique (phosphate facilement accessible et peu coûteux), catalysé par l'enzyme pyruvate kinase (Réaction (5.8)). On mélange dans le même récipient glucose, phosphate de l'énolpyruvate, hexokinase et pyruvate kinase et une quantité catalytique d'ATP (de l'ordre de 1 mole %) et le système fabrique le D-glucose 6-phosphate jusqu'à épuisement du phosphate d'énol pyruvate. Les kinases sont facilement accessibles et, si elles sont immobilisées sur un support insoluble (voir le paragraphe 10.4.1), elles sont réutilisables un certain nombre de fois. On fabrique aisément ainsi le glucose 6-phosphate à l'échelle de 250 g^[6].

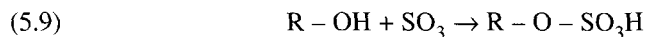


La phosphorylation de l'hydroxyle anomérique donne un phosphate de glycosyle. On prépare ces composés par des méthodes non enzymatiques. Un bref chauffage à 50° du pentaacétate β 5.2 avec H₃PO₄ anhydre donne environ 50 % de phosphate de β-D-glycopyranosyle tétra-acétylé, qui se transforme en anomère α par chauffage prolongé. Ces phosphates de glycosyle sont plus labiles en milieu acide que les monoesters phosphoriques ordinaires.

D'une façon générale les phosphates de sucres sont plus acides que l'acide phosphorique.

5.1.7 Hydrogénosulfates

Un certain nombre de phénomènes de reconnaissance font intervenir des sucres sulfatés. On trouvera des exemples de synthèse au chapitre 17. On prépare un hydrogénosulfate par action du trioxyde de soufre sur l'alcool dissous dans la DMF en présence de triéthylamine (Réaction (5.9)).



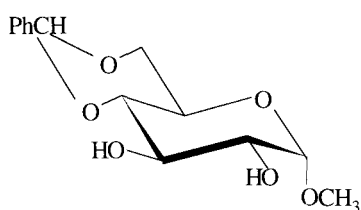
5.2 ACÉTALS^[7]

Les acétals sont bâtis sur un couple d'oxygènes d'hydroxyles. Dans l'acétalisation d'un sucre ou d'un dérivé de sucre qui présente plus de deux hydroxyles libres, plusieurs acétals sont à priori possibles. La plupart du temps, on utilise un catalyseur acide qui accélère l'établissement de l'équilibre entre les acétals possibles et on isole finalement le plus stable comme produit majoritaire.

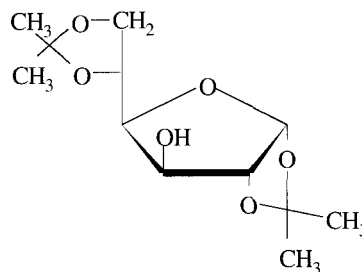
Les aldéhydes forment de préférence des 1,3-dioxanes. Le traitement du glucose par le benzaldéhyde et le méthanol en présence de chlorure de zinc donne

facilement le méthyl 4,6-*O*-benzylidène- α -D-glycopyranoside **5.9**. Cependant, il n'y a pas d'objection à ce que les aldéhydes bouclent un cycle 1,3-dioxolane sur deux hydroxyles *cis* vicinaux s'il n'y a pas d'autre possibilité.

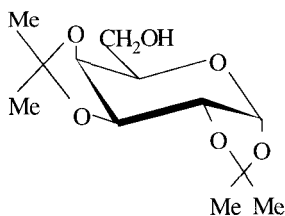
Par contre les cétones ne forment les 1,3-dioxanes que dans des conditions exceptionnelles et généralement bouclent un cycle 1,3-dioxolane sur des hydroxyles *cis*. S'il y a une possibilité tautomérique, le tautomère le plus favorable à ce mode d'acétalisation est sélectionné. Le glucose donne avec l'acétone et le chlorure de zinc le *bis* acétal furanosique 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose, **5.10**, et le galactose le *bis* acétal pyranosique, 1,2 ; 3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose, **5.11**. Mais le méthyl α -D-galactopyranoside, qui ne possède qu'une paire d'hydroxyles vicinaux *cis*, donne le monoacétal **5.12**. Ces préférences s'observent aussi dans l'acétalisation du D-glucitol, représenté selon le zig-zag plan, **5.13** : le benzaldéhyde conduit au tri-acétal **5.14** et l'acétone au tri-acétal **5.15**. Cependant des techniques particulières permettent de prépa-



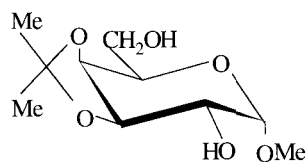
5.9



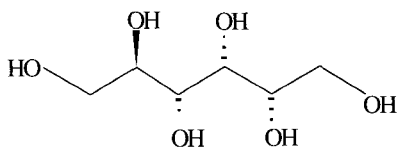
5.10



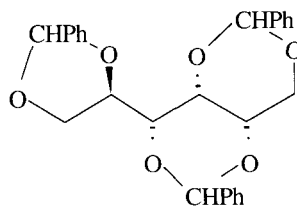
5.11



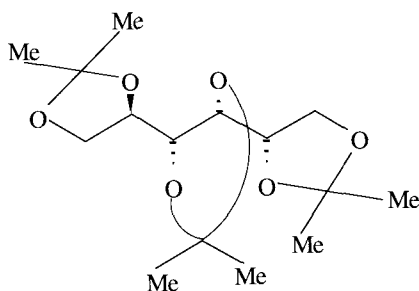
5.12



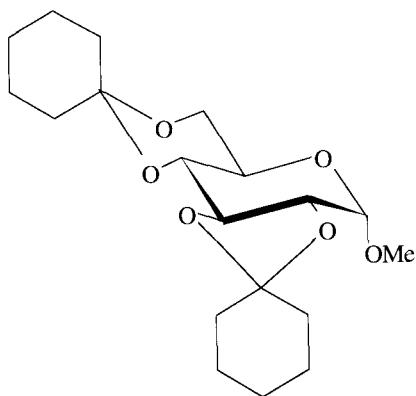
5.13



5.14



5.15

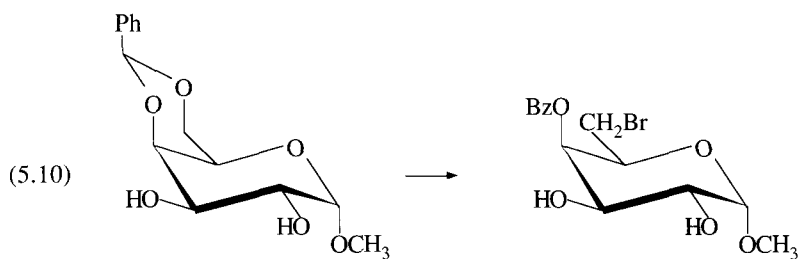


5.16

rer les acétals à haute énergie, tel **5.16** obtenu à partir du méthyl α -D-glucopyranoside par traitement par le diméthyl acétal de la cyclohexanone en présence d'acide paratoluène-sulfonique dans la DMF.

Les benzylidène-acétals, très fragiles en milieu acide, sont hydrolysés par l'acide acétique aqueux, ou coupés par hydrogénolyse. On peut observer une sélectivité dans l'hydrolyse des isopropylidène-acétals. Sur le composé **5.10** seul le cycle en 5,6 est hydrolysé par l'acide acétique aqueux. L'hydrolyse de la fonction acétal qui fait intervenir l'oxygène anomérique nécessite un chauffage de quelques heures dans l'acide minéral 0,1 M, conditions comparables à celles de l'hydrolyse d'un glycoside.

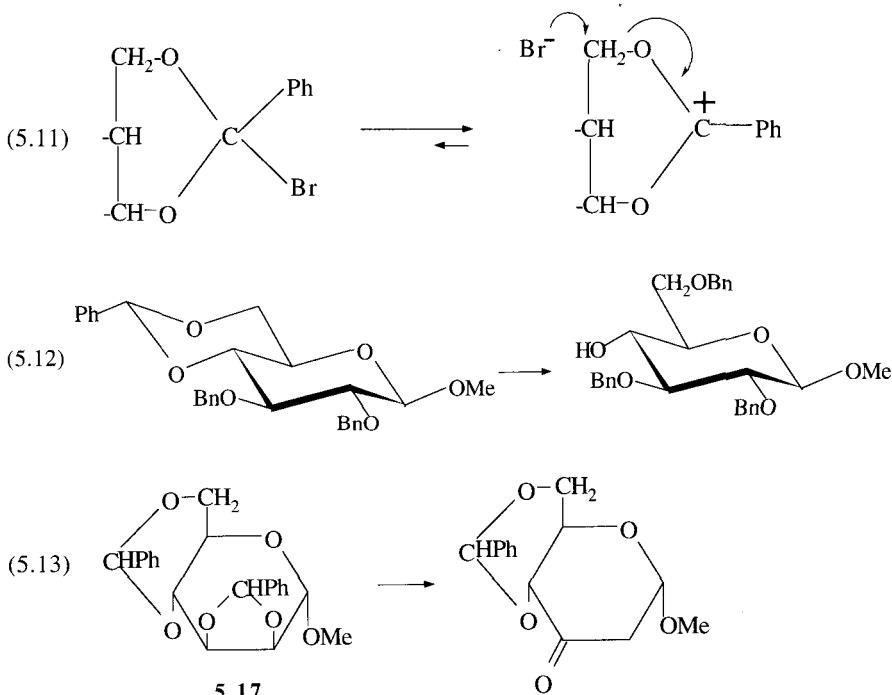
Les acétals sont extrêmement employés comme dérivés protégés. Mais ce sont également les produits de départ de certaines réactions d'un grand intérêt synthétique. Le traitement des acétals benzylidène par la *N*-bromosuccinimide dans CCl_4 bouillant, en présence de BaCO_3 les convertit en bromobenzoates^[8]. La réaction est particulièrement intéressante dans le cas des acétals 4,6-*O*-benzylidène, car elle donne le bromure primaire exclusivement. Ainsi le méthyl 6-bromo-6-déoxy- α -D-galactopyranoside est obtenu avec 90 % de rendement (Réaction (5.10)). Les conditions réactionnelles sont compatibles avec une grande variété de fonctions. Le mécanisme de la réaction semble être le remplacement de l'hydro-



gène benzylique par du brome, suivi d'une ionisation et de l'attaque par le bromure du cation benzoxonium (Réaction (5.11)).

La réaction (5.12) donne un exemple d'ouverture avec réduction d'un benzyldène. Le mélange d'acétal et de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) dans l'oxolane est acidifié avec HCl dans l'éther jusqu'à cessation du dégagement gazeux. La réaction est terminée en 5 mn à température ambiante avec un rendement de 87 % et paraît générale^[9]. On l'interprète comme la conséquence de la protonation régiosélective de O(4) du sucre, suivie du déplacement de l'oxonium par un hydrure.

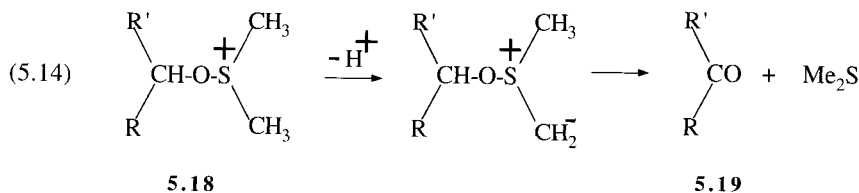
Le traitement du dibenzylidène-mannoside **5.17** (Réaction (5.13)) par le butyllithium donne un sucre carbonylé désoxygéné^[10]. On suppose que la base forte arrache le proton H(3), ce qui entraîne l'élimination de O(2) vicinal, puis le départ de PhCHO qui donne l'énolate.



5.3 OXYDATIONS EN CARBONYLE

5.3.1 Hydroxyles isolés

Les méthodes les plus utilisées sont la réaction de Pfitzner et Moffat et ses variantes ultérieures^[11]. L'oxydant est le diméthylsulfoxyde (DMSO). L'intermédiaire accepté en général à la structure **5.18**, qui conduit au composé **5.19** par une

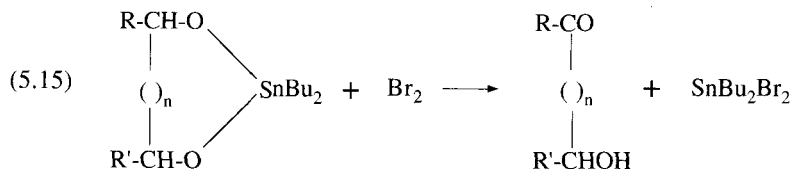


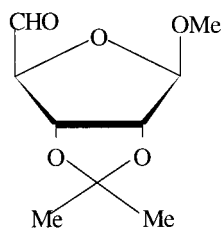
réaction d'élimination (Réaction (5.14)). Les variantes se distinguent par les réactifs employés pour préparer le dérivé sulfoxonium de l'alcool **5.18**. Pour l'oxydation de la fonction alcool primaire des sucres en aldéhyde, on préconise le système dicyclohexylcarbodiimide ($\text{C}_6\text{H}_{11} - \text{N} = \text{C} = \text{N} - \text{C}_6\text{H}_{11}$, 3 équivalents molaires), associée à un acide modéré, comme l'acide dichloracétique (0,5 équivalent). Ainsi on obtient l'aldéhyde **5.20** (2 heures 30 à froid, 80 % isolé) à partir du ribofuranoside. On peut activer simplement avec de l'anhydride phosphorique pour l'oxydation des fonctions alcool secondaires en cétone, comme dans la préparation de **5.21**, obtenu avec un rendement de 92 %^[12]. On a ainsi préparé la cétone **5.22** à partir de l'acétal **5.10**. On a aussi observé d'excellents rendements en présence d'anhydride acétique. On peut effectuer ces oxydations à des échelles très élevées. La méthode de Swern (activation par le chlorure d'oxalyle) donne en général un rendement élevé, mais nécessite un travail à -70°C et semble peu adaptée aux premières étapes d'une synthèse.

On a également appliqué aux sucres une autre méthode générale de préparation des cétones, l'oxydation des alcools secondaires par le tétraoxyde de ruthénium, RuO_4 . On n'utilise que des quantités catalytiques de ce composé très coûteux, qui est régénéré par un oxydant, par exemple KIO_4 en solution aqueuse, tamponné avec K_2CO_3 , ou un hypochlorite alcalin.

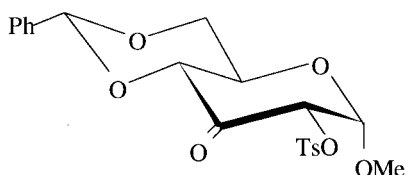
5.3.2 Oxydation des diols en hydroxycétones

Le traitement des stannylènes (voir le paragraphe 5.15) dissous dans le benzène par une solution de brome dans le même solvant, en présence de tamis moléculaire ou de la base Bu_3SnOMe , donne à froid, à la vitesse d'un titrage la cétone-alcool^[13]. La réaction est presque uniformément strictement régiospécifique, c'est-à-dire qu'elle ne donne qu'une seule des deux hydroxy cétones possibles (Réaction (5.15)). On retrouve l'activation sélective par stannylation déjà observée dans la benzylation, l'allylation et l'acylation. On prépare ainsi **5.24** à partir du glycol **5.23** avec 75 % de rendement. On a récemment préconisé le remplacement du brome par la *N*-bromosuccinimide sans autre addition^[14].

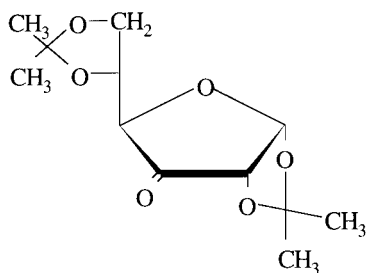




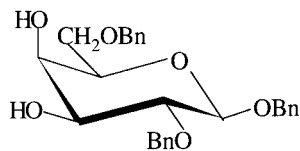
5.20



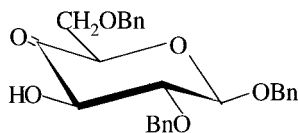
5.21



5.22



5.23



5.24

5.3.3 Utilité synthétique des sucres carbonylés

La réduction par NaBH_4 ou LiAlH_4 donne le mélange d'alcools épimères. Dans les cas les plus favorables, on peut séparer avec un rendement acceptable le composant à configuration inversée par rapport au produit de départ. Ainsi on prépare le 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-allose par une oxydation du *bis* acétal **5.10** en cétone **5.22** suivie d'une réduction par NaBH_4 . Celle-ci est stéréospécifique et donne la configuration α -D-*allo*, épimère en 3 de la configuration α -D-*gluco* de départ. Sauf cas exceptionnels, cette méthode d'inversion de configuration a perdu de l'importance au profit de la substitution $\text{S}_{\text{N}}2$ des sulfonates depuis la découverte des solvants polaires aprotiques et des groupements partants exceptionnels. Naturellement, les hydrures marqués permettent d'introduire spécifiquement du deutérium ou du tritium sur le carbone hydroxylé. Ces dérivés carbonylés de sucres sont facilement hydratables. Par incubation prolongée dans

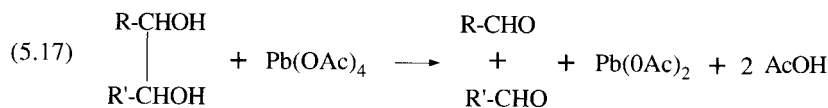
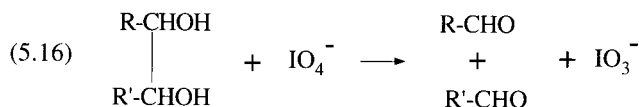
$[^{18}\text{O}] - \text{H}_2\text{O}$, l'équilibre hydratation-déshydratation peut introduire sur le carbonyle l'isotope ^{18}O , qu'on retrouvera après réduction, désormais stable, sur l'hydroxyle alcoolique. Enfin, les voies majeures de préparation des sucres ramifiés passent par les dérivés carbonylés (voir le paragraphe 7.6).

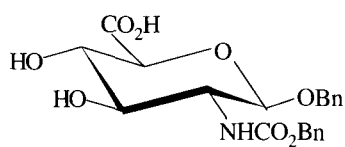
5.3.4 Oxydations catalytiques sur platine

La réaction est particulièrement efficace et sélective avec les glycopyranosides non protégés : la fonction alcool primaire est convertie en acide avec un bon rendement. On obtient donc des acides uroniques. Ainsi le dérivé **5.25** de la glucosamine est obtenu avec un rendement de 75 %. Pratiquement, on ajoute le sucre à une suspension aqueuse de platine d'Adams vigoureusement agitée dans laquelle on fait barboter de l'oxygène. Il peut y avoir oxydation des hydroxyles secondaires avec une certaine sélectivité lorsqu'il n'y a pas d'hydroxyle primaire.

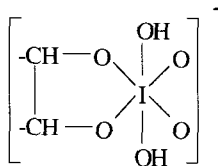
5.4 PERIODATES ALCALINS ET TÉTRAACÉTATE DE PLOMB

On rappelle les réactions bien connues de ces deux oxydants sur les glycols vicinaux, (5.16) et (5.17). Ces deux réactifs sont complémentaires, le periodate est utilisé en solution aqueuse et le tétraacétate dans les solvants organiques. On admet que ces réactions passent par des intermédiaires cycliques, par exemple, pour IO_4^- , **5.26**, par addition des hydroxyles sur les liaisons IO, et **5.27** par déshydratation de **5.26**, le premier octaédrique, le second en bipyramide trigonale. Nous ferons remarquer que vu la longueur de la liaison IO, l'angle O—I—O dans le cycle à 5 éléments a une valeur très petite voisine de 75° et que cela a sans doute une conséquence sur la réaction. Quoi qu'il en soit, la déshydratation en **5.27** semble fondamentale. Dans un milieu très basique, **5.26** perd un proton, la déshydratation n'est plus possible et la réaction devient très lente. De même les complexes tridentés comme **5.28**, qui ne peuvent pas se déshydrater sont stables et visibles en RMN^[15]. Le lecteur reconnaîtra que **5.28** est un complexe du 1,2-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose, produit d'hydrolyse partielle de **5.10**. De fait, le périodate ne scinde pas les glycols vicinaux en disposition *trans* diaxiale rigide. Cependant signalons que l'on peut observer avec le tétraacétate des oxydations de glycols vicinaux incapables de participer à un cycle à 5 éléments.

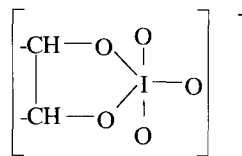




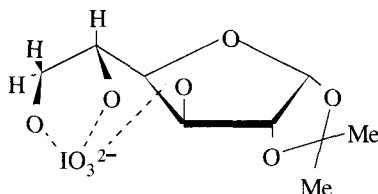
5.25



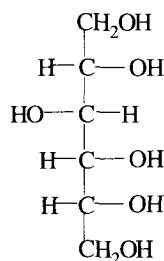
5.26



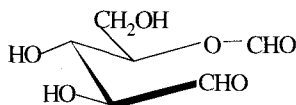
5.27



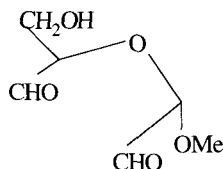
5.28



5.29



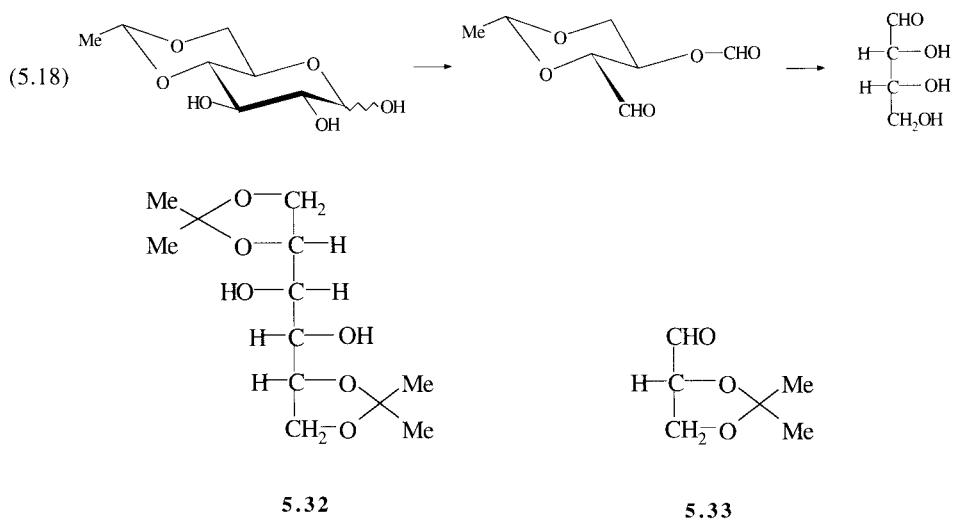
5.30



5.31

A côté des glycols, périodate et tétraacétate effectuent la scission d'autres composés polyoxygénés vicinaux que l'on rencontre en chimie des sucres – 2-hydroxyaldéhydes, dicétones vicinales, acides α -cétoniques et α -hydroxylés – et aminoalcools. Sur le papier, la scission des α -hydroxyaldéhydes par les périodates répond au mécanisme général (5.17) en admettant que l'aldéhyde est hydraté ($R = OH$), ce qui donne au second membre $HO \cdot CHO$, c'est-à-dire de l'acide formique. Le lecteur vérifiera que, par ce mécanisme, le glucitol **5.29** consomme 5 molécules de périodate, fournit 2 molécules de formaldéhyde, qui proviennent des carbones terminaux, et 4 molécules d'acide formique venant des carbones centraux. La réaction est stœchiométrique. L'oxydation de l' α -D-glucopyranose commence par la rupture de la liaison C(1) - C(2) et la formation du pentose formylé en 4, **5.30**. Elle se poursuit et, si le formiate s'hydrolyse dans le milieu, la consommation est de 5 molécules de périodate et il se forme 5 molécules d'acide formique et 1 molécule de formaldéhyde, qui provient de C(6). Le méthyl α -D-glucopyranoside est scindé entre C(2) et C(3), et C(3) et C(4), pour donner 1 molécule d'acide formique et le « dialdéhyde » **5.31** (en fait hydraté et cyclisé).

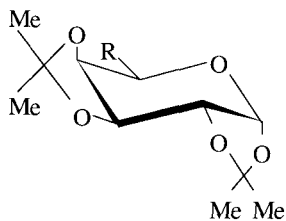
Les réactifs de scission de glycols ont joué un grand rôle dans la construction de la chimie des carbohydrates. Nous ne citerons que des exemples d'applications récentes. Le caractère stœchiométrique de ces réactions permet de les utiliser dans les dosages. La possibilité de séparer les carbones, par exemple C(6), le seul donnant CH_2O à partir du glucose, ou bien C(3), retrouvé à l'état d'acide formique dans l'oxydation du méthyl α -D-glucopyranoside, etc., permet de localiser un carbone isotopique dans les études de métabolisme intermédiaire. L'utilisation contemporaine la plus importante est dans les synthèses par dégradation. On prépare commodément le D-érythrose à partir du D-glucose par acétalisation avec l'acétaldéhyde, catalysée par H_2SO_4 , oxydation périodique et hydrolyse acide (Réaction (5.18)). L'oxydation du « diacétone mannitol », **5.32**, par le tétraacétate de plomb donne deux molécules d'isopropylidène-glycéraldéhyde, **5.33**, matière première importante en synthèse chirale.

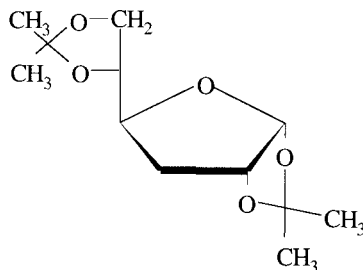


5.5 DÉSOXYGÉNATION

Nous avons déjà rencontré deux exemples de sucres désoxygénés universellement présents dans les cellules, le désoxyribose et le fucose. Il y en a un grand nombre d'autres, dans les produits bactériens en particulier, et souvent leur rareté suggère de les préparer par synthèse. Enfin les sucres abondants, qui sont très utiles en synthèse chirale, sont beaucoup trop fonctionnalisés pour être utilisés tels quels.

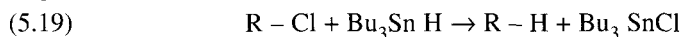
Les *tosylates primaires* sont réduits par LiAlH_4 . On prépare ainsi le diacétal du D-fucose **5.35**, énantiomère du L-fucose, par réduction du tosylate **5.34** du diacétal du D-galactose **5.11**. On peut aussi remplacer un hydroxyle alcoolique par un halogène (Cl, Br, I) à n'importe quelle position dans un sucre protégé.


5.34 $R=CH_2OTs$

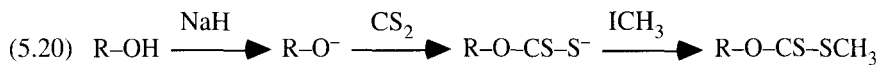
5.35 $R=CH_3$


5.36

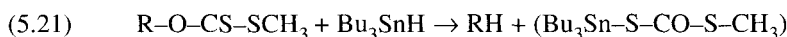
L'halogénure est facilement réduit par voie radicalaire avec le tributylstannane, Bu_3SnH (Réaction (5.19)).



On pourra sans doute remplacer dans cette réaction le tributylstannane par l'acide hypophosphoreux H_3PO_2 , ou un sel de triéthylammonium comme dans le cas de la réaction de désoxygénation décrite à la fin du présent paragraphe. La méthode la plus directe pour désoxygéner un hydroxyle isolé passe par la formation d'un dithiocarbonate (Réactions (5.20)).



La réduction par le tributylstannane est une réaction en chaîne, qui doit être amorcée par l'azoisobutyronitrile. Le bilan global est donné par la réaction (5.21). Le produit contenant l'étain se décompose rapidement et le rendement en produit réduit est excellent.



L'emploi de Bu_3SnH présente quelques inconvénients : il est toxique et coûteux ; il faut 291 g de réactif pour apporter 1 g d'hydrogène et l'excès de réactif et les sous-produits de la réaction sont difficiles à éliminer. On a proposé récemment comme donneur d'hydrogène alternatif l'acide hypophosphoreux H_3PO_2 – ou ses sels de triéthylammonium dans les cas où l'acidité est à éviter – qui donnent des résultats au moins aussi bons que les stannanes dans la réaction radicalaire. On obtient ainsi le diacétal du glucofuranose désoxygéné en 3, **5.36** avec 91 % de rendement par réduction du méthyl dithiocarbonate du « diacétone-glucose » **5.10**^[16].

RÉFÉRENCES

- [1] P. A. Manthorpe et R. Gigg, *Methods Carbohydr. Chem.*, 8 (1980) 305-311.
- [2] S. David et A. Thieffry, *J. Org. Chem.*, 48 (1983) 441-447.

- [3] S. Hanessian et P. Lavallée, *Can. J. Chem.*, 53 (1975) 2975-2977 ; 55 (1977) 562 - 565.
- [4] G. Excoffier, D. Gagnaire et J. P. Uille, *Carbohydr. Res.*, 39 (1975) 368-373.
- [5] S. David et S. Hanessian, *Tetrahedron*, 41 (1985) 643-663.
- [6] A. Pollak, R. L. Baughn et G. M. Whitesides, *J. Amer. Chem. Soc.*, 99 (1977) 2366-2367.
- [7] J. Gelas, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 39 (1981) 71-150.
- [8] S. Hanessian, *Carbohydr. Res.*, 2 (1966) 86-88.
- [9] P. J. Garegg, H. Hultberg et S. Wallin, *Carbohydr. Res.*, 108 (1982) 97-101.
- [10] A. Klemer et G. Rodemeyer, *Chem. Ber.*, 107 (1974) 2612-2614 ; D. Horton et W. Weckerlé, *Carbohydr. Res.*, 44 (1975) 227-240.
- [11] G. H. Jones et J. G. Moffatt, *Methods Carbohydr. Chem.*, 6 (1972) 315-322.
- [12] K. Onodera et N. Kashimura, *Methods Carbohydr. Chem.*, 6 (1972) 331-336.
- [13] S. David et A. Thieffry, *J. Chem. Soc. Perkin I*, (1979) 1568-1573.
- [14] X. Kong et T. B. Grindley, *J. Carbohydr. Chem.*, 12 (1993) 557-571.
- [15] A. S. Perlin et E. von Rudlof, *Can. J. Chem.*, 43 (1965) 2071-2077.
- [16] D. H. R. Barton, D. O. Jang et J. Cs. Jaszberenyi, *J. Org. Chem.*, 58 (1993) 6838-6842.

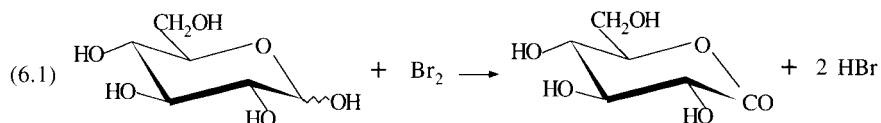
Réactions du carbonyle et de l'hémiacétal

6.1 INTRODUCTION

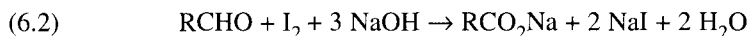
Lorsque la protection des hydroxyles empêche la transformation du carbonyle en hémiacétal par cyclisation, la réactivité d'un sucre ne se distingue pas de celle d'un aldéhyde ou d'une cétone ordinaire, liés à des groupements très électronégatifs, avec éventuellement un oxygène étheré en β . On observe donc la formation d'hydrates stables dans l'eau et une β élimination, si la stéréochimie le permet, en milieu alcalin. Quant au sucre habituel hémiacétal, la rapidité de l'établissement de l'équilibre tautomérique fait qu'il donne toutes les réactions des composés carbonylés. En fait, c'est plutôt l'instabilité éventuelle d'un réactif dans le solvant qui limite son application. Comme réaction typique de l'hémiacétal, nous avons déjà rencontré la glycosidation. L'oxydation par les halogènes, par laquelle nous allons commencer, en est un autre exemple.

6.2 OXYDATION PAR LES HALOGÈNES^[1]

Les oxydants Cl_2 , Br_2 , I_2 s'emploient de manière différente. Si on traite un sucre en solution aqueuse non tamponnée par le chlore ou le brome, l'oxydation amène l'acidification du milieu par suite de la formation de HCl ou HBr . Il semble que ceci ralentisse la réaction et on a les meilleurs rendements, presque quantitatifs, en ajoutant un sel insoluble, comme BaCO_3 , qui joue le rôle de tampon. Dans l'oxydation par le brome, dans ce système, le pH est voisin de 5,4. C'est la forme cyclique qui est oxydée. Le D-glucopyranose (α ou β) donne la D-glucono-1,5-lactone (Réaction (6.1)). Industriellement, on pratique la réaction dans une cellule d'électrolyse ; le brome est régénéré par oxydation anodique du bromure, dont on ajoute seulement une quantité catalytique. L'anomère β réagit beaucoup plus vite que l'anomère α . L'oxydation est essentiellement due au brome moléculaire. On admet qu'il y a formation d'un hypobromite, qui subit ensuite une élimination E_2 schématisée par la formule partielle 6.1. L'oxydation par le brome est une voie préparative d'accès aux acides gluconique, galactonique, etc.



L'iode n'est pas réactif en milieu acide. En milieu basique, il est converti en hypoiodite, un oxydant puissant, et oxyde quantitativement les aldoses en acides aldoniques, selon la réaction (6.2) qui a aussi bien une valeur analytique que préparative.



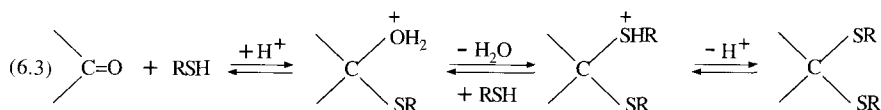
6.3 RÉACTIFS NUCLÉOPHILES

6.3.1 Borohydrure de sodium

Ce réactif, stable dans l'eau dans des conditions très légèrement alcalines est idéal pour la réduction des sucres. La fonction aldéhyde est réduite en alcool primaire et la fonction cétone en un mélange d'alcools secondaires épimères. Le traitement le plus simple après réduction consiste à éliminer le sodium sur une colonne d'échangeur de cations, puis l'acide borique sous forme de borate de méthyle volatil par coévaporation avec du méthanol. On récupère l'alditol par évaporation à sec ou lyophilisation.

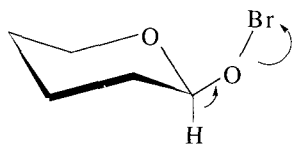
6.3.2 Thiols^[2]

Les dithioacétals, obtenus par action des thiols sur les sucres, constituent la classe la plus nombreuse de dérivés acycliques des sucres. On prépare le diéthyl dithioacétal **6.2** en traitant le glucose dissous dans HCl 11 M par l'éthanethiol EtSH, quatre heures à 0°. On se débarrasse de l'excès d'acide avec BaCO₃ ou PbCO₃, ou un échangeur d'anions, et on obtient le produit par évaporation à sec. La réaction est très générale. On utilise communément l'éthanethiol, le benzylthiol, l'éthanedithiol et le 1,3-propanedithiol. Le thiophénol réagit très lentement. On l'observe avec tous les aldoses, selon le mécanisme probable, réversible, (6.3).

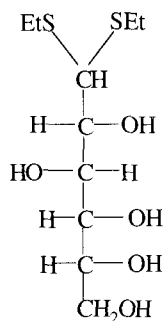


On voit qu'à la seconde étape, c'est une deuxième molécule de thiol plutôt qu'un hydroxyle du sucre qui déplace H₂O. Ceci doit être mis en rapport avec la nucléophilie élevée du soufre vis-à-vis du carbone. Les cétooses sont décomposés dans ces conditions. Pour préparer les dithioacétals du fructose, on passe par le peracétate *kéto* **6.3** qui est le produit normal de peracétylation. Cependant le carbonyle de l'acide sialique est transformé en diéthyl-dithioacétal **6.4** avec un excellent rendement à température ordinaire. Le carboxyle α et la lactonisation dans le milieu aident sans doute à la conversion.

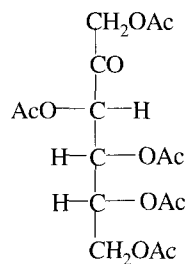
Le dithioacétal du glucose et certains autres se décomposent à température ambiante dans le milieu de synthèse, en donnant des alkyl 1-thioglycopyrano-



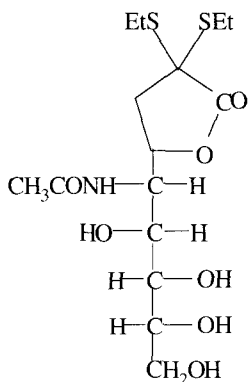
6.1



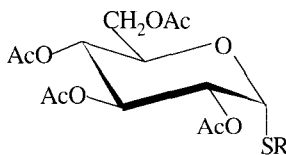
6.2



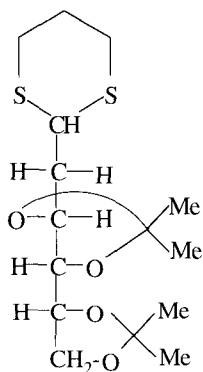
6.3



6.4



6.5



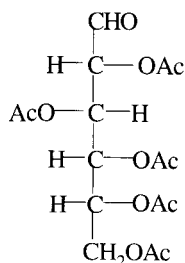
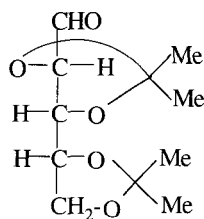
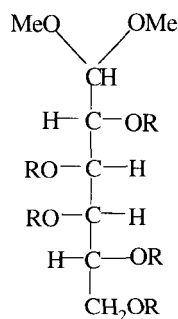
6.6

sides. Cette classe de composés a pris une certaine importance dans la synthèse d'oligosaccharides (Réaction (10.4)). On les prépare plus commodément, sous forme peracétylée, par exemple **6.5**, en traitant le β peracétate du pyranose par un thiol en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

On peut effectuer sur les dithioacétals toutes les transformations habituelles des hydroxyles des sucres, étherification, acylation, acétalisation. Par exemple, le propylène dithioacétal du « 2-désoxyglucose » donne le *bis* acétal isopropylidénique **6.6**. Les règles de préférence pour les positions d'acétalisation s'apparentent à celles des alditols. Les dithioacétals acylés peuvent être désacylés par méthanolyse alcaline, ce qui indique qu'ils supportent ce niveau de basicité. Cependant le butyllithium détache le proton situé entre les deux soufres. Ceci crée une charge négative sur C(1) et, s'il y a un oxygène étheré en α , sur C(2), il y a tout de suite élimination, pour former un groupement $-\text{CH} = \text{C}(\text{SPh})_2$. Par contre, le carbanion sur C(1) est stable dans les dithioacétals de sucres 2-désoxy et on peut le condenser avec des dérivés iodés. On a ainsi une méthode facile d'introduction de certaines chaînes chirales, utilisable en synthèse totale.

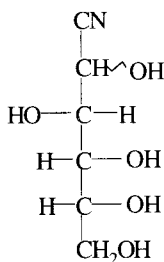
La désulfuration au nickel de Raney remplace le groupement dithioacétal par un méthyle.

Cependant on prépare essentiellement les dithioacétals comme intermédiaires dans la synthèse de dérivés acycliques. On peut en effet régénérer le carbonyle dans des conditions qui respectent la plupart des fonctions usuelles. Bien que la régénération avec l'iode soit quantitative et que le brome soit utilisable d'une façon préparative, la faveur semble aller aux systèmes à base de sels mercuriques. Si les hydroxyles cyclisables sont bloqués, on prépare ainsi un dérivé acyclique de sucre. Par exemple la peracétylation de **6.2** donne un pentaacétate, transformable en pentaacétate *aldéhyde* **6.7** par HgCl_2 en excès dans l'acétone aqueuse. On prépare de même le *bis* isopropylidène-acétal *aldéhyde* **6.8** à partir du diéthyl dithioacétal du D-arabinose. La solvolysé dans le méthanol avec un mélange $\text{HgCl}_2 - \text{HgO}$ conduit au diméthyl acétal, par exemple **6.9**, en série D-*galacto*, désacétylable en **6.10** par $\text{Ba}(\text{OMe})_2$.

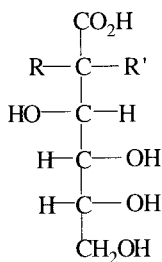
**6.7****6.8****6.9** R=Ac**6.10** R=H

6.3.3 Cyanures alcalins

On prendra comme exemple la réaction de KCN en solution aqueuse sur le D-arabinose. L'addition a lieu à température ambiante et donne le mélange de nitriles α hydroxylés **6.11**. Le chauffage en milieu alcalin hydrolyse ces nitriles en acides carboxyliques, obtenus à l'état de sel. On récupère le mélange d'acides libres, gluconique **6.12** et mannonique **6.13**, avec un échangeur de cations, et on sépare l'épimère D-gluco **6.12** par cristallisation fractionnée du D-gluconate de baryum. L'acide régénéré est lactonisé par chauffage prolongé à 100° et la réduction de la lactone **6.14** par l'amalgame de sodium donne le D-glucose. Cette suite de réactions, connue sous le nom de méthode de Fischer et Kiliani, est absolument générale. C'est une méthode d'ascension dans la série des sucres du tableau 4.1 à partir de glycéraldéhyde. On l'utilise actuellement pour préparer des sucres supérieurs (heptoses à partir d'hexoses) ou des sucres rares. Ainsi la même suite de réactions permet d'obtenir le L-glucose et le L-mannose, deux raretés, à partir d'un sucre naturel très abondant, le L-arabinose. Elle sert aussi à préparer les

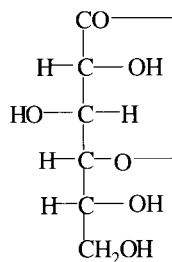


6.11



6.12 R=H, R'=OH

6.13 R=OH, R'=H

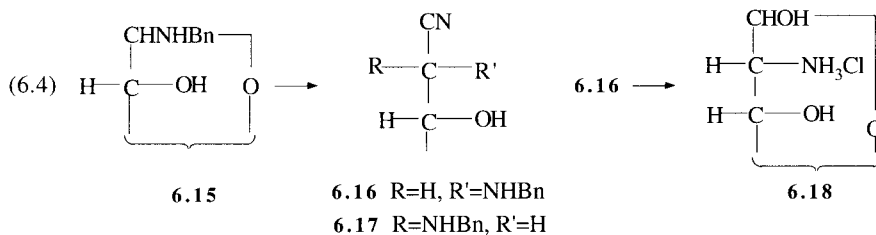


6.14

sucres marqués spécifiquement avec un isotope du carbone, car les cyanures $[\text{}^{14}\text{C}]\text{-KCN}$ et $[\text{}^{13}\text{C}]\text{-KCN}$ sont des produits commerciaux.

Dans une modification^[3], on pratique l'addition à un pH contrôlé voisin de 7.5, que l'on abaisse à 4,2 en fin de réaction. Les nitriles sont stables dans ces conditions. On les réduit en imines par hydrogénation avec le catalyseur palladium sur sulfate de baryum. Ces imines sont hydrolysées rapidement en aldoses. C'est la méthode préconisée pour la préparation de sucres marqués sur C(1).

Nous décrivons ici la synthèse des sucres aminés de Kuhn, bien qu'elle implique le passage par une glycosylamine (voir le paragraphe 3.6.1) parce qu'elle est conceptuellement analogue (Réaction (6.4)). L'addition de HCN sur la *N*-benzyl-glycosylamine **6.15** donne les nitriles épimères, **6.16** et **6.17**. Chacun des deux donne par hydrogénation catalytique sur palladium en présence d'acide chlorhydrique le sucre 2-amino-2-déoxy de même configuration (par exemple **6.18**), le groupement benzyle étant simultanément éliminé à l'état de toluène. La réussite majeure de cette méthode est la synthèse de la lactosamine décrite au paragraphe 10.1.



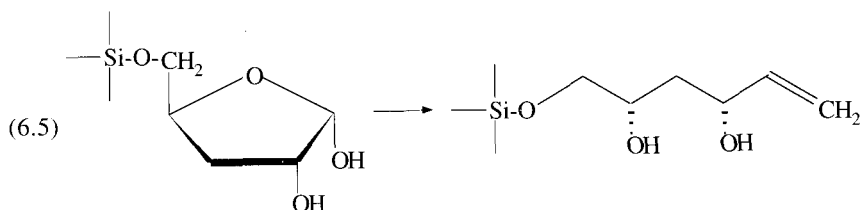
6.18

6.3.4 Réactifs du type de Wittig et organométalliques

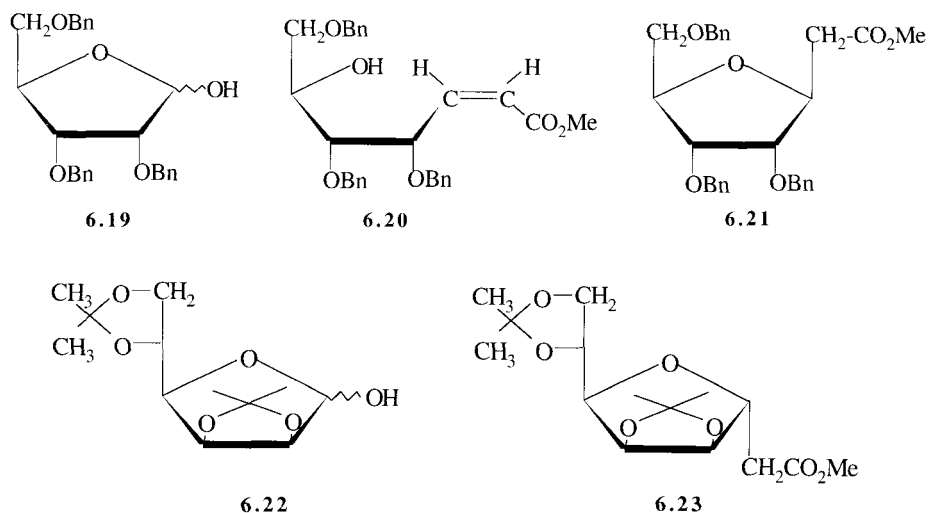
Comme nous l'avons dit dans l'introduction, les réactions d'un sucre bloqué dans sa forme tautomérique *aldéhyde* ne diffèrent pas essentiellement de celles d'un aldéhyde quelconque. Par exemple, on peut observer des additions d'organomagnésien, d'organolithien, etc. Ces réactions peuvent être très utiles, notamment en synthèse totale chirale, mais c'est, en principe, une chimie qui doit être

familière au lecteur. Nous n'envisageons ici que les sucres totalement libres ou capables de tautomériser aldéhyde-hémiacétal.

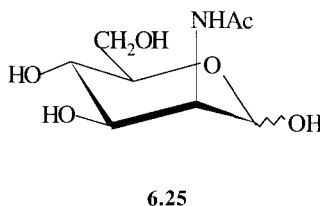
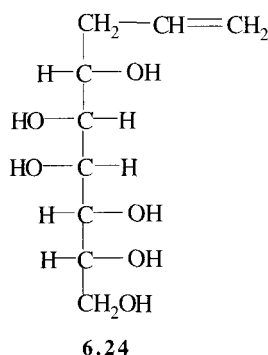
Dans certaines conditions, on peut utiliser avec ces substrats le triphénylméthylène phosphorane, $\text{CH}_2 = \text{PPh}_3$, par exemple la méthylénation décrite par la réaction (6.5) s'effectue avec un rendement de 67 % à -30° dans l'oxolane, avec addition de un équivalent de NaH : le succès tient à la stabilité en milieu alcalin de l'aldéhyde, qui n'a pas d'oxygène en β , tandis que la déprotonation de l'hydroxyle en α crée une charge négative qui s'oppose à une seconde déprotonation sur $\text{CH}^{[4]}$.



Il y a plus de réactions décrites^[5] avec les phosphoranes stabilisés comme $\text{Ph}_3\text{P} = \text{CHCO}_2\text{Et}$. Le ribofuranose **6.19** donne 54 % d'éthylénique *cis*, **6.20**, accompagné de 36 % de l'isomère *trans*. En présence de NaOMe, la cyclisation de **6.20** par une réaction de type Michael donne l'oxolane **6.21**, pur *trans*-1,2. En raison de l'analogie superficielle de composés comme **6.21** avec les glycosides, on leur a donné le nom de *C*-glycoside. Avec le même phosphorane, le *bis* acétal du mannofuranose **6.22** donne directement le *C*-mannofuranoside **6.23**, *trans* 1,2. Celui-ci s'isomérise en dérivé *cis*-1,2, le plus stable, en présence de NaOMe, le mécanisme probable étant la déprotonation en α de la fonction ester suivie de l'élimination de l'oxygène cyclique sous forme alcoolate.



Les dérivés organiques du magnésium et du lithium ne sont pas utilisables dans les solvants aqueux, et, en milieu anhydre, les substrats polyhydroxylés entraînent le gaspillage du réactif. La découverte d'une technique pour fabriquer et faire réagir les dérivés allyliques de l'étain dans l'eau^[6] a permis d'effectuer ces réactions organométalliques en solution aqueuse^[7]. On a opéré en solvant mixte alcool-eau, en présence de 2 équivalents de poudre d'étain et de bromure d'allyle, dans un bac à ultrasons. Le mannose, par exemple, donne avec un rendement de 90 % le mélange du carbinol **6.24** avec son épimère dans la proportion 6:1. L'ozonisation de la double liaison donne le sucre 2-désoxy à deux carbones de plus. On peut remplacer l'étain par l'indium.

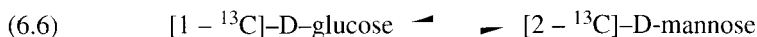


6.4 RÉACTIONS IMPLIQUANT LA DÉPROTONATION EN α DU CARBONYLE. LES SUCRES COMME ALDOLS

En milieu basique, on prévoit un équilibre entre le sucre et le carbanion produit par le détachement du proton α . La première conséquence prévisible est l'épimérisation partielle à ce niveau. La réaction peut avoir une valeur préparative si le sucre de départ est abondant.

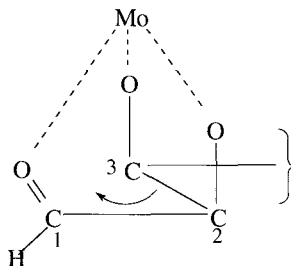
Ainsi, on peut préparer la *N*-acétylmannosamine **6.25** par épimérisation de la *N*-acétylglucosamine (**1.7**) en solution aqueuse, au pH 11. Le rendement est 22 % après 3 jours à température ambiante, mais le produit de départ est très accessible.

Ces épimérisations sont générales, mais plus ou moins utiles en dehors de l'exemple cité. Nous ferons ici une parenthèse pour les mettre en regard de l'épimérisation produite par l'acide molybdique (à 90° en solution aqueuse, pH 4,5) qui n'implique pas de carbanion et qui est également générale^[8]. Glucose et mannose s'équilibrent et le rapport des concentrations (2,5:1) est celui qu'on calcule à partir de leur différence d'enthalpie libre. C'est typiquement une réaction d'une simplicité trompeuse, car il y a simultanément migration de carbone de la position 1 à la position 2 (Réaction (6.6))

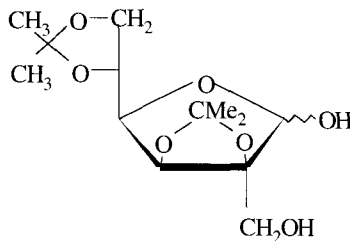


On a ainsi une méthode très élégante pour marquer C(2) dans un sucre, l'introduction de l'isotope sur C(1) étant facile avec les réactions du paragraphe 6.3.3.

On l'explique par la formation d'un complexe entre le dimolybdate Mo_2O_5^- et le sucre, par exemple le D-glucose, sous forme *aldéhydo* et une migration réversible de C(3) à C(1) au sein du complexe, suivant le schéma très simplifié 6.26.

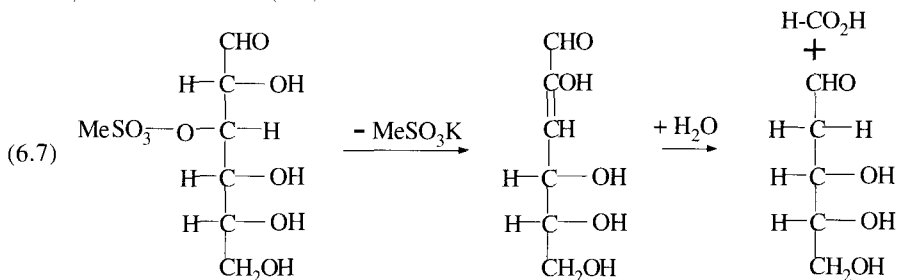


6.26



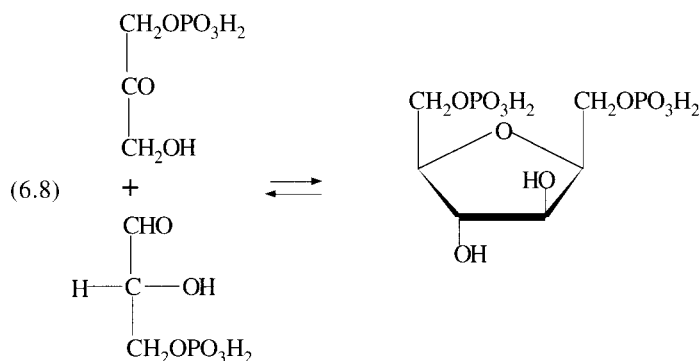
6.27

Revenons maintenant aux propriétés conséquences de la déprotonation de C(2) des aldoses. L'anion peut réagir comme donneur sur un aldéhyde pour donner un produit de condensation aldolique. Par exemple le « diacétone-mannose » donne le sucre ramifié 6.27. Ce qui restreint la généralité de ces réactions, c'est qu'il y a le plus souvent un oxygène étheré sur C(3) qui a tendance à s'éliminer s'il n'y a pas des contraintes stériques particulières. C'est ce qui se passe, par exemple, lors du traitement alcalin de certaines glycoprotéines (voir le paragraphe 13.2.2). Mais on peut vouloir au contraire favoriser l'élimination, en introduisant un bon groupement partant sur O(3), tel le groupement méthanesulfonyle. L'élimination en solution aqueuse tiède du 3-*O*-méthanesulfonyl-D-glucose par addition de potasse aqueuse se produit à la vitesse d'un titrage acidimétrique, comme on l'observe en présence de phthaléine. En arrêtant à la coloration permanente, on obtient du 2-désoxy-D-ribose, dont c'est la meilleure préparation^[9], avec un rendement de 50 %, selon la réaction (6.7).



Tous les aldoses communs possèdent un hydroxyle alcoolique en β du carbonyle. Cette structure les apparente aux aldols qui se forment réversiblement à partir des aldéhydes en milieu alcalin. On pourrait s'attendre à observer dans ces conditions la rupture rétro-aldolique entre C(2) et C(3), donnant une molécule d'aldéhyde glycolique et une molécule d'aldose à deux carbones de moins et, réciproquement, la condensation de ces deux fragments pour engendrer un aldose

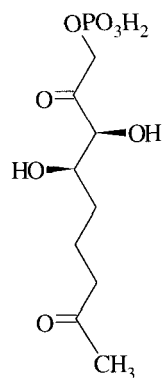
supérieur. Sous leur forme non enzymatique, ces réactions sont inconnues ou de peu d'importance pratique et, dans les cellules vivantes, ces schémas du type $C_4 + C_2 \rightleftharpoons C_6$, ou bien $C_3 + C_2 \rightleftharpoons C_5$ ne sont pas utilisés dans les grandes voies métaboliques. Il existe cependant des enzymes *aldolases*, isolées de cellules végétales ou microbiennes qui catalysent la rupture rétroaldolique d'un phosphate du désoxyribose en acétaldéhyde et phosphate de D-glycéraldéhyde. Leur rôle est purement catabolique dans le monde vivant, car les cellules fabriquent la structure 2-déoxy-D-*ribo* par désoxygénation de la structure D-*ribo*. Elles pourraient être utiles en chimie préparative car on peut dans une certaine mesure modifier donneur et accepteur^[10]. Mais dans les aldolases habituelles, le donneur est cétonique.



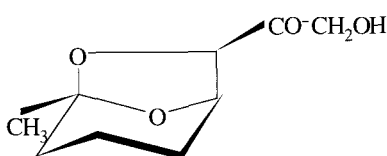
On a beaucoup étudié la fructose-1-6-diphosphate aldolase du muscle du lapin, que l'on trouve dans le commerce. Celle des feuilles d'épinard, évidemment très accessible, a été examinée récemment^[11]. Dans la réaction fondamentale de la glycolyse (6.8), le donneur est le phosphate de dihydroxyacétone. Il ne peut guère varier, mais il y a plus de souplesse du côté de l'accepteur^{[12][13]}, et l'on peut parfois s'éloigner largement de la chimie des sucres. Dans tous les cas, le diol vicinal créé aux positions 3-4 (numérotation des uloses) a la configuration D-*thréo*. Ainsi la condensation de l'aldéhyde cétonique **6.28** donne un cétose **6.29** qui, après isolement, est déphosphaté enzymatiquement en présence de phosphatase acide. L'acétalation en catalyse acide referme un système de type anhydro sucre sur le carbonyle en 8, plus électrophile. Le produit **6.30**, obtenu^[14] avec un rendement global de 48 %, est transformé en une phéromone, la (+)-*exo*-Brévicomine par réduction du groupement COCH_2OH en CH_2CH_3 . On voit que, dans la plupart des synthèses, la condensation enzymatique doit être suivie de déphosphatation, ce qui n'est pas un inconvénient très grave. Il y a des difficultés plus sérieuses : la préparation de grosses quantités de phosphate de dihydroxy-acétone ne semble pas très commode, en raison des grands volumes de solvants nécessaires ; le produit de l'aldolisation est un cétose, qui n'est pas facilement isomérisable en aldéhyde. D'autres aldolases fonctionnent avec l'acide pyruvique comme donneur, par exemple la « sialylaldolase », dont l'utilisation synthétique est décri-



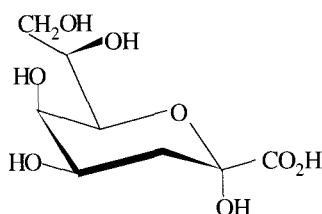
6.28



6.29



6.30

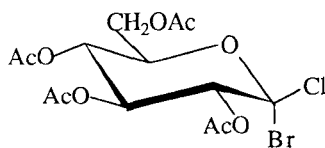


6.31

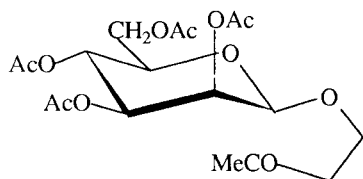
te au paragraphe 12.4, et la « KDO aldolase » utilisable pour la synthèse d'un sucre du monde microbien et végétal, le « KDO » **6.31**.

6.5 FONCTIONNALISATION RADICALAIRE AU CENTRE ANOMÉRIQUE^[15]

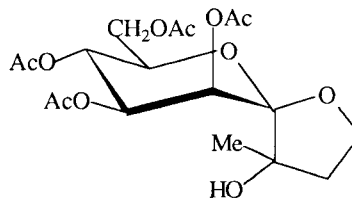
L'irradiation de dérivés pyranosiques produit un radical au centre anomérique. En présence de brome, ou de *N*-bromo succinimide, le chlorure de β -D-glucopyranoside péricétylé donne le sucre dihalogéné géminé **6.32**, matière première pour la synthèse d'analogues géminés sur C(1). Le mannoside **6.33** subit une réaction de type NORRISH II, qui donne l'oxolane **6.34**. En présence d'iode et de HgO, le glucoside de glycol, **6.35**, donne le spiro orthoester, **6.36**, sans doute par formation intermédiaire d'un hypoiodite.



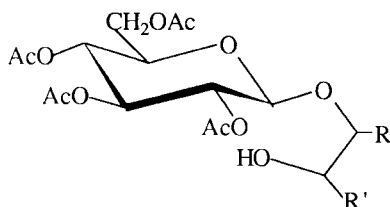
6.32



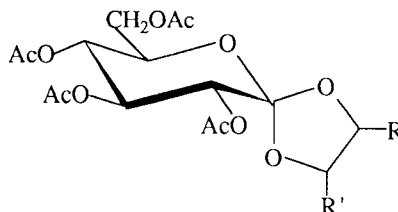
6.33



6.34



6.35



6.36

RÉFÉRENCES

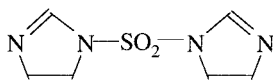
- [1] J. W. Green, « Oxidatives Reactions and Degradations » dans *The carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, sous la direction de W. Pigman et D. Horton ; vol. 1B, p. 1106-1119, 2^e éd. Academic Press, New York (1980).
- [2] J. D. Wander et D. Horton, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32 (1976) 15-123.
- [3] A. S. Serianni, H. A. Munez et E. Barker, *Carbohydr. Res.*, 52 (1979) 71-78.
- [4] K. C. Nicolaou, R. A. Daines, J. Uenishi, W. S. Li, D. P. Papahatjis et T.K. Chakraborty, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 4672-4685.
- [5] H. Ohrui, G. H. Jones, J. G. Moffatt, M. L. Maddox, A. T. Christenson et S. Byram, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 4602-4613.
- [6] C. J. Luche et J. C. Damiano, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 7926-7927.
- [7] E. Kim, D. M. Gordon, W. Schmid et G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 58 (1993) 5500-5507.
- [8] M. L. Hayes, N. J. Pennings, A. S. Serianni et R. Barker, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 6764-6769.
- [9] E. Hardegger, M. Schellenbaum, R. Huwyler et A. Züst, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1815-1818.
- [10] L. Chen, D. P. Dumas et C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 741-748.
- [11] M. L. Valentin et J. Bolte, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 8103-8106.
- [12] S. David, C. Augé et C. Gautheron, *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 49 (1991) 189-194.
- [13] M. D. Bednarski, E. S. Simon, M. Bischofberger, W. D. Fessner, M. J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann et G. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 627-635.
- [14] M. Schultz, H. Waldmann, H. Kunz et W. Vogt, *Liebigs Am. Chem.*, (1990) 1010-1024.
- [15] G. Descotes, dans *Carbohydrates, Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry*, édité par H. Ogura et coll., VCH (1992) 89.

Changements de configuration Sucres non saturés et ramifiés

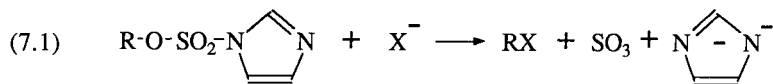
7.1 DÉPLACEMENT DES HYDROXYLES ALCOOLIQUES

La méthode la plus fréquente de déplacement d'un hydroxyle alcoolique commence par sa conversion en sulfonate. Les sulfonates des hydroxyles cycliques des sucres sont très peu réactifs vis-à-vis des nucléophiles externes. C'est sans doute une conséquence de la fonctionnalisation élevée de la molécule, qui conjugue empêchement stérique et effet inducteur défavorable. La substitution, pratiquement impossible avec les anciennes techniques, n'est devenue une opération courante qu'à la suite de deux innovations. La première est l'introduction de solvants polaires aprotiques. Parmi ceux-ci, le solvant favori est la *N, N*-diméthylformamide, car c'est le plus facile à éliminer en fin d'opération, par exemple par extraction à l'eau d'une solution étherée. Cependant, même dans la DMF bouillante, certains toluènesulfonates et méthanesulfonates sont inertes. Aussi la seconde innovation a-t-elle été l'introduction de deux groupements partants d'une efficacité supérieure, le trifluorométhanesulfonate (triflate) et l'imidazolylsulfonate (imidazylate). L'efficacité des triflates, $\text{CF}_3\text{-SO}_2\text{-OR}$, est sans doute liée à la stabilité de l'anion CF_3SO_3^- , elle-même une conséquence de l'acidité élevée de l'acide $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$. On les prépare commodément par action sur l'alcool de l'anhydride $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$ en présence d'une base, comme la pyridine, qui peut aussi jouer le rôle de solvant. Les inconvénients liés à l'emploi des triflates sont le prix élevé du réactif, leur instabilité vis-à-vis de l'humidité et leur incompatibilité avec le groupement acétamido, sauf précautions spéciales^[1].

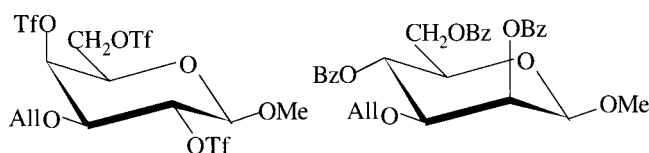
Le réactif pour la préparation des imidazylates est le sulfuryl-bis-imidazole **7.1**, produit indéfiniment stable, préparé par action du chlorure de sulfuryle sur l'imidazole. Il réagit sur les alcoolates pour donner l'imidazylate **7.2**. La réaction (7.1) de substitution nucléophile^[2] donne comme sous-produits les produits de fragmentation, SO_3 et imidazolate. On peut expliquer l'efficacité comme une conséquence de cette fragmentation, qui rend irréversible la rupture de la liaison R-O consécutive à une grande elongation vibrationnelle dans le complexe activé SN_2 . L'inconvénient des imidazylates est que leur préparation la plus commode passe par l'alcoolate, donc implique des conditions basiques. Leurs avantages sont leur stabilité à température ambiante – plusieurs jours dans l'eau – et le coût négli-



7.1



7.2



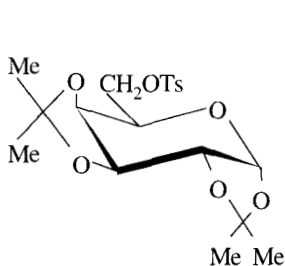
7.3

7.4

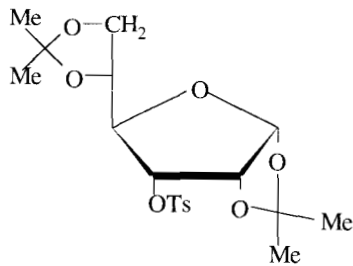
geable du réactif. Ce sont donc les dérivés les plus recommandables au début d'une séquence synthétique.

Suivant leur emplacement sur un sucre, les sulfonates ont des réactivités très différentes. Ceci se manifeste, par exemple, dans le comportement des tosylates. Le tosylate de la fonction alcool primaire est substituable sans difficultés, même dans les solvants n'appartenant pas au groupe polaire-aprotique. La substitution en 3 ou 4 n'est possible qu'en solution dans la DMF. La substitution en 2 est rigoureusement impossible. En revanche, on l'observera souvent sans problème à la position 2 à partir d'un triflate ou d'un imidazolate. Ces différences de réactivité apparaissent clairement dans la réaction de triple substitution du *tris* triflate β -D-*galacto* **7.3** par le benzoate^[3]. On prépare celui-ci quantitativement à partir du triol en 5 heures à 0°. Il réagit quantitativement avec le benzoate de tétrabutylammonium en solution toluénique à température ambiante en 45 minutes pour donner le produit de substitution sur C(4) et C(6), D-*gluco*. Le chauffage, une heure à 100°, conduit ensuite au tribenzoate D-*manno* **7.4**.

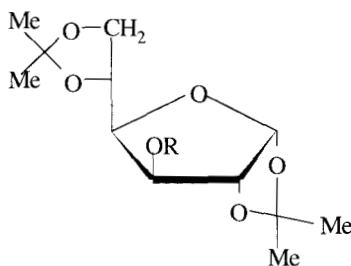
Ces prédictions générales de réactivité doivent être quelquefois révisées à la baisse en raison de contraintes stériques, même sur une position primaire. Par exemple, le tosylate α -D-*galacto* **7.5** est extrêmement peu réactif, sans doute à cause de l'encombrement du groupement isopropylidène voisin. La comparaison des tosylates α -D-*allo* **7.6** et α -D-*gluco* **7.7** est significative. On substitue le tosylate **7.6** par NaN_3 par un chauffage de 4 heures dans la DMF à 140°. Dans les mêmes conditions, il faut 15 jours pour obtenir le produit de substitution du tosylate α -D-*gluco* **7.7**, parce que l'azoture N_3^- doit s'introduire en *endo* entre deux pentagones^[4]. C'est dans ce contexte qu'une expérience^[2] démontre magistralement l'efficacité des nouveaux groupements partants : la substitution de l'imida-



7.5

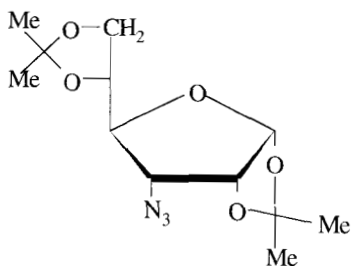


7.6

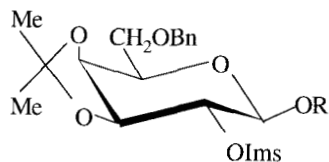


7.7 R=Ts

7.8 R=Im



7.9



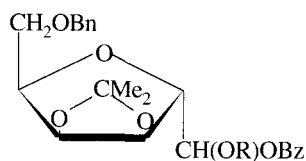
7.10

zylate α -D-glucose **7.8** donne l'azoture α -D-allo **7.9** avec 62 % de rendement en 5 heures dans le toluène à 80°. Comme nous l'avons dit, la substitution sur C(3) du « diacétone-glucose » est contrecarrée parce que le nucléophile doit s'approcher dans le volume *endo*. On observe une opposition analogue lorsque le nucléophile doit s'introduire avec une orientation axiale gênée par une interaction diaxiale-1,3 avec le reste de la molécule. Ainsi, lorsqu'on tente la substitution par le benzoate de l'imidazylate β -D-galacto **7.10**, on observe l'attaque intramoléculaire par l'oxygène cyclique, avec formation du dérivé **7.11**, 2,5-anhydro.

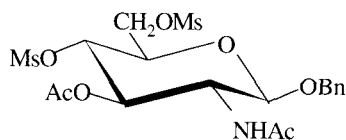
Les nucléophiles les plus couramment utilisés sont les sels des acides acétiques et benzoïques, qui conduisent aux acétates et benzoates de sucres de configuration opposée, les halogénures, les thiolates, qui permettent d'introduire un atome d'halogène ou un radical alkylthio, et enfin les nucléophiles azotés, dont nous allons parler un peu plus longuement. Parmi ces derniers, on a utilisé NH_3 et $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ et il peut y avoir des cas où leur emploi est préférable, mais l'anion azoture ($\text{N}=\text{N}=\text{N}^-$) jouit présentement d'une grande faveur. Sa structure cylindrique lui donne un très faible encombrement. De fait, son enthalpie libre conformationnelle (voir le paragraphe 2.5) est presque négligeable. Enfin il n'est que faiblement basique. Or le risque d'élimination E_2 existe aussi avec les sucres, s'il y a un proton antiparallèle au sulfonate sur le carbone voisin. L'azoture organique est facilement transformé en amine par réduction avec LiAlH_4 , ou un thiol, ou par hydrogénation catalytique. Son introduction est incompatible avec une protection allyl éther.

Les deux exemples suivants montrent l'utilité des réactions de substitution pour préparer des sucres peu accessibles, mais importants dans le cadre de ce livre. La *N*-acétylgalactosamine est très coûteuse alors que son épimère en 4, la *N*-acétylglucosamine est disponible en grosses quantités. Pour faire un β -glycoside de la *N*-acétylgalactosamine, on aura avantage à préparer l'analogue *D*-gluco, par exemple **7.12**, préparé pour la substitution des positions 4 et 6, qui conduit, après déprotection, au glycoside **7.13**^[5]. La *N*-acétylmannosamine est également un sucre très coûteux, dont la chimie a été à peine explorée. Pour préparer ses dérivés, on a trouvé utile^[6] de passer par l'azoture **7.15**, lui-même obtenu par substitution de l'imidazolate **7.14**.

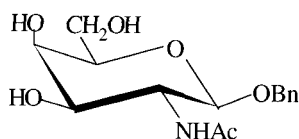
On donnera au paragraphe 10.3.4 un exemple d'application de ces méthodes à la synthèse des glycosides du type *cis*-1,2, équatorial-axial.



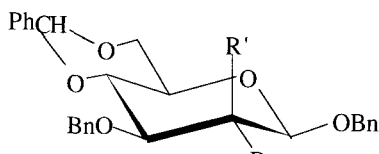
7.11



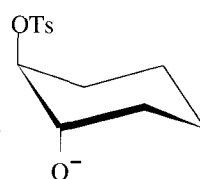
7.12



7.13



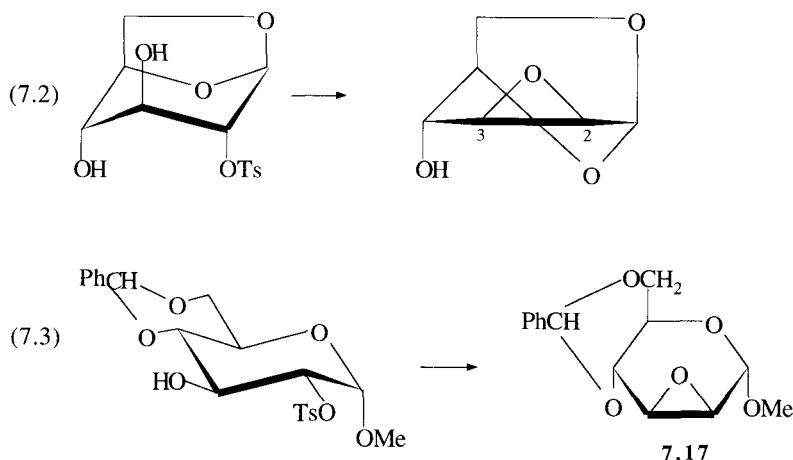
7.14 R=O-Ims, R'=H

7.15 R=H, R'=N₃

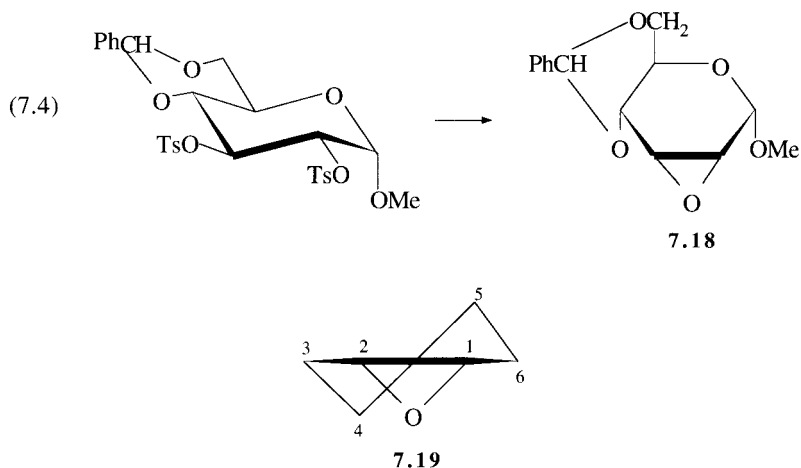
7.16

7.2 ÉPOXYDES^{[4] [7]}

Pour qu'un cycle d'époxyde puisse se boucler, il faut qu'il y ait deux fonctions vicinales, sulfonate (ou halogénure) et alcoolate en position antiparallèle. Cette condition est peu contraignante en dehors des cycles et on bâtit facilement un époxyde sur les carbones C(5) – C(6) d'un furanose. Dans un cycle à 6 éléments, elle implique une conformation *trans* diaxiale **7.16** des fonctions réagissantes. La fermeture de l'époxyde est alors extrêmement rapide. La réaction (7.2) donne un exemple qui peut paraître extrême, car on peut imaginer que l'époxyde obtenu est une molécule très tendue en raison de ses trois cycles. De plus, c'est une réaction de substitution (interne) sur la position 2 peu réactive. Néanmoins, elle est complète en 10 mn à température ambiante en présence de NaOMe molaire. Cependant, on observe aussi la fermeture d'époxydes à partir de substituants *trans* diéquatoriaux dans des conditions modérées, tout au plus un chauffage peu prolongé à 100°C. On peut penser que le supplément à l'énergie d'activation est dû à la nécessité de passer par une conformation moins stable où les fonctions réagissantes se rapprochent de la disposition **7.16**. La réaction (7.3) est une excellente voie d'accès à l'époxyde **7.17**.



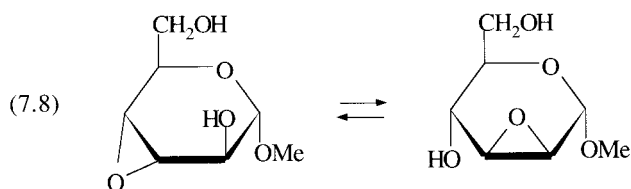
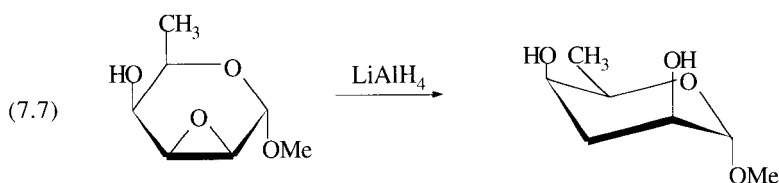
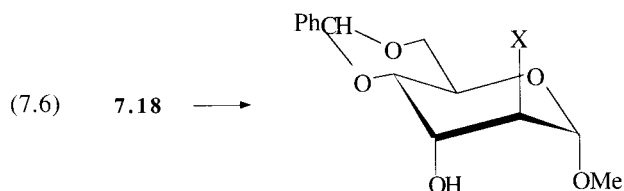
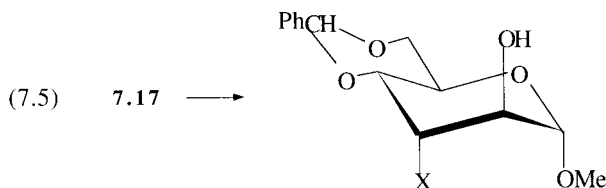
On peut remplacer l'hydroxyle alcoolique vicinal par toute fonction transformable en alcoolate dans les conditions très basiques de la synthèse, par exemple acétate. Plus surprenante est la préparation, évidemment très commode, à partir des ditosylates *trans* (Réactions (7.4)). Cette réaction se produit à 0°C et, cependant, elle implique une rupture hétérolytique entre oxygène et soufre qu'il n'est pas du tout commode de réaliser par voie intermoléculaire. Nous observons que c'est le tosylate sur C(3) qui est déplacé, ce qui conduit à un époxyde α -D-*allo* **7.18**. On retrouve encore ici l'inertie de la position 2 vis-à-vis de la substitution.



La fermeture de l'oxirane entraîne la coplanarité de quatre atomes du cycle pyranose, et une conformation demi-chaîse **7.19** (les sommets de l'hexagone sont oxygène ou carbone). Ces époxydes de sucres manifestent la même grande réactivité que les autres, en particulier vis-à-vis des nucléophiles. On sait que l'ouverture des époxydes cyclohexaniques est « *trans*-diaxiale », selon la règle de Fürst-Plattner. Cette règle a été établie avec des stéroïdes rigides. Si les sommets 3, 4, 5, 6 de l'hexagone de la structure **7.19** sont maintenus de façon presque rigide, il n'y a qu'une conformation chaise possible par ouverture de l'oxirane et la définition des positions axiales dans le produit final ne soulève aucune ambiguïté. Dans le cas où on arrive à une chaise mobile, on peut objecter à la règle que la conformation de cette chaise et, partant, la définition des positions axiales, ne sont pas indépendantes des nouveaux substituants du cycle. Dans le cas des pyranoses, disons que l'ouverture se fait de façon à donner le produit diaxial dans la chaise bâtie sur les atomes 3, 4, 5, 6 supposés maintenus presque rigide. Si cette conformation est instable, la molécule prend la conformation chaise alternative et les deux substituants introduits se retrouvent en position *trans*-diéquatoriale. On connaît des exemples de cette situation, mais, bien souvent les substituants se retrouvent finalement en position *trans* diaxiale.

Un grand nombre de nucléophiles ouvrent les époxydes de sucres, si bien que ces dérivés ont une grande utilité synthétique. On a décrit des réactions avec les nucléophiles oxygénés hydroxyle, alcoolate, benzoate, phosphate, eau en milieu acide, les nucléophiles soufrés thiolate, thiobenzoate et thiocyanate, et les nucléophiles azotés ammoniac, amines et azoture en présence de chlorure d'ammonium. On a ainsi les ouvertures diaxiales typiques de la réaction (7.5) à partir de l'époxyde α -D-*manno* ($X = OH, OCH_3, NH_2, N_3, SCH_3, SCN$) et de la réaction (7.6) à partir de l'époxyde α -D-*allo* ($X = OH, OCH_3, NH_2$). L'aluminohydrure de lithium se comporte comme le nucléophile H^- ($X = H$) dans les deux réactions précédentes, ce qui permet une bonne préparation des sucres désoxygénés, par exemple

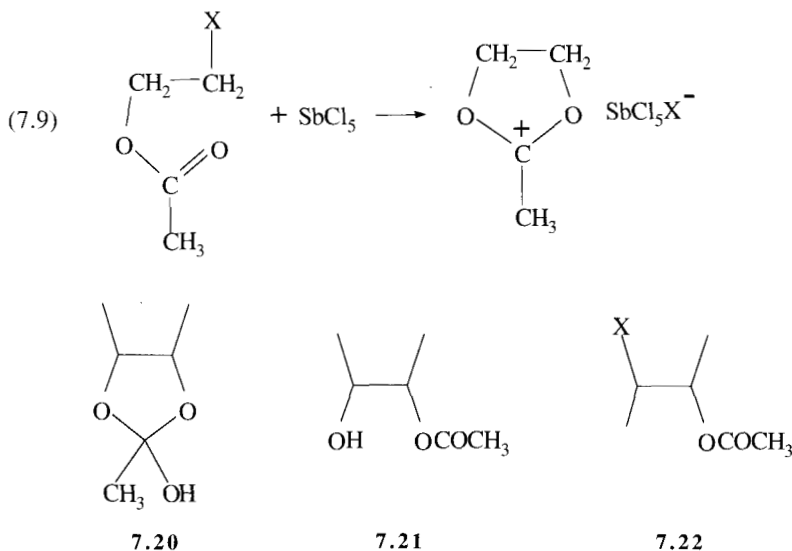
(7.7). Les nucléophiles carbonés ouvrent les époxydes *bis* secondaires en donnant des sucres ramifiés ; ils seront traités au paragraphe 7.6.3. Naturellement, si la structure s'y prête, les époxydes peuvent aussi s'ouvrir par voie intramoléculaire. L'ouverture par un alcoolate vicinal *trans*. s'accompagne alors du bouclage d'un autre cycle. Avec un alcoolate vicinal, ceci conduit à une migration d'époxyde, plus ou moins réversible, telle l'isomérisation (7.8), observée en milieu basique.



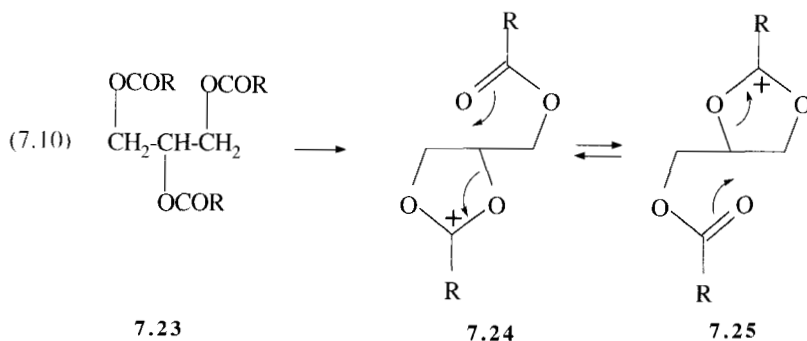
7.3 LES IONS ACYLOXONIUMS CYCLIQUES^[8]

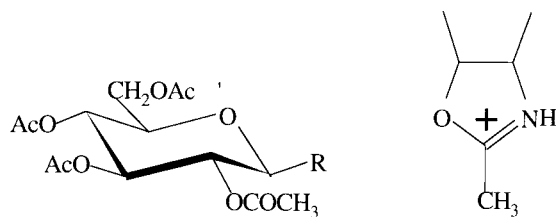
Il y a plusieurs manières de préparer les ions acyloxoniums cycliques. Nous ne traiterons que de l'action du pentachlorure d'antimoine sur les diacétates vicinaux et les acétates chlorés ou bromés sur le carbone vicinal, car c'est la technique qui a permis les réactions les plus intéressantes en chimie de sucres (Réactions (7.9)). Le cation acyloxonium est ambident : la réaction dite *cinétique* a lieu sur le site le plus chargé, par exemple H_2O et OH^- donnent l'orthoester instable **7.20** qui s'ouvre en hydroxy ester *cis* **7.21** ; la réaction dite *thermodynamique*, avec acétate

en milieu acide, chlorure et bromure conduit à la formation du produit *trans* **7.22** (X = AcO, Cl, Br).



Le tripivalate de glycérol, **7.23** (Réaction (7.10)), peut réagir par cyclisation avec la participation de l'un ou l'autre des groupements pivaloyl terminaux, en donnant deux acyloxoniums identiques **7.24** et **7.25**. Ces deux cations sont en équilibre, par suite de l'attaque *trans* du carbonyle ester sur le cycle acyloxonium. L'interconversion est assez lente à la température ambiante. On observe deux signaux de méthyle en RMN du proton, celui des méthyles du groupement pivalate, Me_3CCOO^- , et celui des méthyles du groupement pivaloyloxonium, décalé vers les champs faibles par la proximité d'une charge positive. La vitesse d'interconversion augmente rapidement avec la température et on observe la coalescence à 87°C . On peut calculer à partir de ces observations une enthalpie libre d'activation $\Delta G^\ddagger = 18,55 \pm 0,06 \text{ kcal mol}^{-1}$ à cette température, en solution dans le nitrométhane.



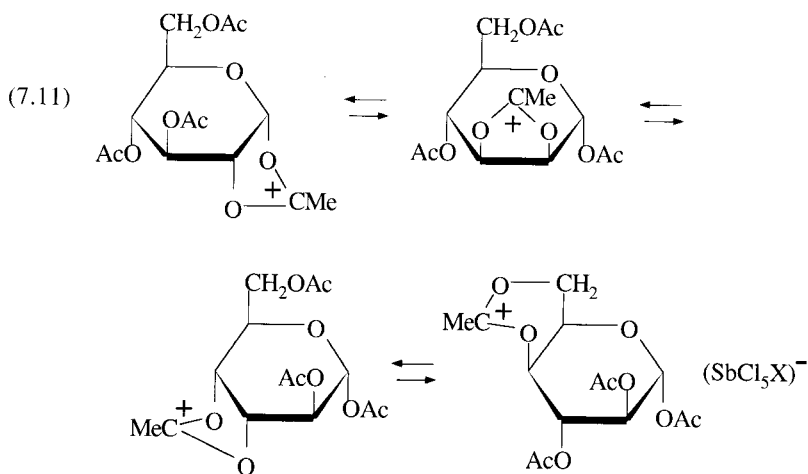


7.26 R=OAc

7.28

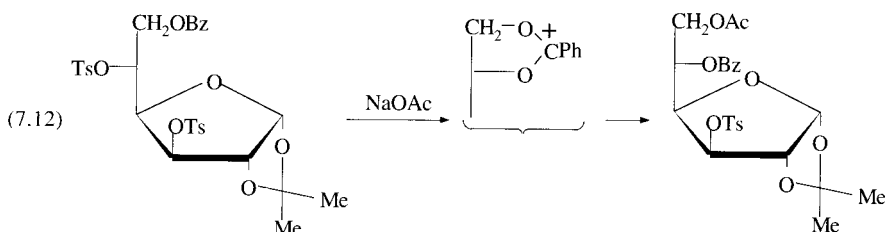
7.27 R=Cl

On ne peut observer une réaction propre avec les pyranoses que si l'on s'arrange pour orienter la première cationisation sur C(1). Avec le glucose, le pentaacétate β , **7.26** et le chlorure de tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyle **7.27** ont la disposition favorable à l'attaque par le carbonyle de l'acétate en C(2). Le chlorure α , anomère de **7.27** réagit aussi en raison de la facilité avec laquelle il s'ionise en ion oxocarbenium. L'un quelconque de ces trois précurseurs, en solution dans le dichlorométhane traité à 20°C, donne un mélange en équilibre de cations acétoxonium dérivés des quatre configurations, *D*-gluco, *D*-manno, *D*-altro et *D*-ido (7.11). On détermine la composition du mélange par hydrolyse. On a alors le mode *cis* de décomposition, qui donne un mélange de sucres partiellement acétylés. On peracétyle le mélange et on détermine sa composition par chromatographie de vapeur. A température ordinaire, l'équilibre entre les cations acétoxonium dérivés des quatre configurations correspond aux proportions suivantes : *D*-gluco : 54 % ; *D*-manno 13 % ; *D*-altro 6-9 % ; *D*-ido 21 %. Mais comme l'hexachloroantimonate du dérivé *D*-ido est très peu soluble dans le dichlorométhane, il se sépare par cristallisation, ce qui déplace l'équilibre, si bien qu'on peut l'isoler avec 73 % de rendement. On a ainsi un accès très facile à cette configuration rare.

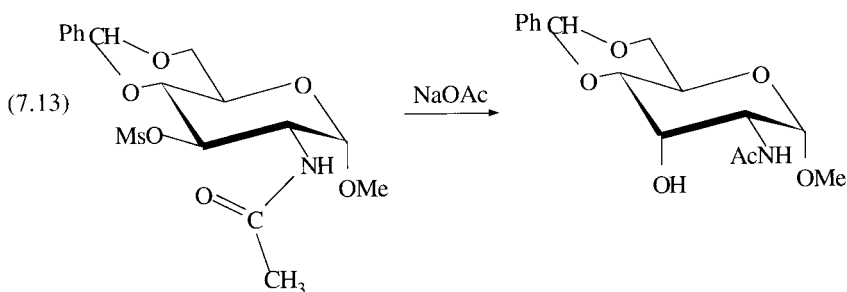


7.4 DÉPLACEMENTS NUCLÉOPHIQUES AVEC PARTICIPATION

Les ions acyloxonium du paragraphe 7.3 sont stabilisés par un anion lourd. On admet aussi la formation d'acyloxonium, cette fois comme intermédiaires réactionnels non isolés, dans la solvolysé de certains tosylates. Dans la réaction (7.12) avec l'acétate de sodium, l'introduction de l'acétate en 6 et la migration du benzoate en 5 témoignent du passage par un intermédiaire benzoxonium. De même, la solvolysé des sulfonates présentant un groupement acétamido *trans* vicinal passe par un cation oxazolinium 7.28, analogue d'un acyloxonium.



L'ouverture dite « *cis* » du côté de l'oxygène donne le même résultat que la substitution SN2 du sulfonate. Mais on observe une substitution dans des conditions où une réaction SN2 sans participation serait inappréciable. Ainsi la réaction (7.13) donne 66 % de rendement en 40 heures au reflux du méthylcellosolve (124°), ce qui est tout de même un traitement relativement énergique, mais n'implique pas de solvants polaires aprotiques^[9]. A partir de l'anomère β du même substrat dans la DMF, le nucléoside PhCH₂SK donne un mélange de benzyl thioéthers avec rétention et inversion de configuration (correspondant respectivement aux ouvertures « *trans* » et « *cis* » du cation oxazolidinium) et d'oxazolidine, produit de déprotonation de ce cation.



7.5 SUCRES NON SATURÉS

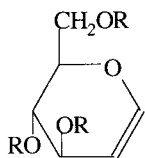
7.5.1 Glycols

On obtient le prototype 7.29 par réduction par le zinc et l'acide acétique du bromure de tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyle. On peut imaginer que le départ de

bromure laisse un cation oxocarbénium, réduit au stade anion par le zinc, et que la réaction se termine par élimination C(1) – C(2) d'acétate. Du triacétate **7.29**, on passe au glycal libre **7.30** par méthanolyse alcaline. Cette voie d'accès est générale et peut servir aussi, par exemple, à la préparation de l'isomère D-galactal. Les glycals, facilement accessibles et capables de réactions variées, ont un grand potentiel synthétique^[10].

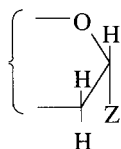
Les glycals sont des éthers d'énols et donnent lieu à des additions électrophiles. Avec un réactif dissymétrique, la partie électrophile s'additionne sur C(2), de façon à faire apparaître un ion oxocarbénium relativement stable en C(1). Ainsi l'eau, les alcools et les acides carboxyliques, en catalyse acide, donnent respectivement le sucre 2-désoxy (**7.31**, Z = OH), le glycoside 2-désoxy (**7.31**, Z = OR) et l'ester (**7.31**, Z = OCOR). Les conditions, qui catalysent aussi l'anomérisation, conduisent à l'anomère le plus stable. Les acides HCl et HBr donnent les chlorures et bromures de 2-déoxyglycosyle (**7.31**, Z = Cl, Br). Chlore et brome donnent chacun les deux dérivés halogénés possibles, par exemple, à partir du tri-O-acétyl-D-glucal, α -D-glucosyl (**7.32**, 60 %) et α -D-mannosyl (**7.33**, 30 %). Là encore, l'étape initiale, due à la molécule de brome ou au cation Br⁺ électrophile engendre un cation oxocarbénium centré sur C(1), qui, en présence de sels d'argent, capte une molécule d'un solvant alcoolique, pour donner un α -glycoside, 2-bromo-2-désoxy, par exemple **7.34**. En revanche, le couplage des bromures **7.32** ou **7.33** en présence de carbonate d'argent donne le glycoside β de la façon attendue. On élimine facilement l'halogène dans tous ces composés par voie radicalaire et on arrive ainsi aux sucres 2-désoxy. La méthoxymercuration de **7.29** ou **7.30** avec l'acétate mercurique dans le méthanol fabrique une liaison carbone-mercure. Le triacétylglucal **7.29** donne, après remplacement de l'acétate ionique par du chlore, le glycoside β **7.35**, mélangé à son isomère α -D-manno (les deux produits sont *trans*-1,2). Le D-glucal libre donne le méthyl 2-acétoxymercure-2-désoxy- α -D-mannopyranoside avec un rendement élevé. La réduction au borohydrure remplace le mercure par de l'hydrogène. Enfin les peracides, qui se comportent en première approximation comme des sources de cations OH⁺, reconstituent des pyranoses à partir des glycals. Ce peut-être un procédé commode pour inverser la configuration en C(2) d'un sucre. Ainsi, du galactose on passe au D-galactal **7.36**, puis, par traitement avec de l'acide perbenzoïque en solution aqueuse, à un mélange de galactose et de talose^[11]. Ce sucre rare **7.37** est facilement séparable du galactose par cristallisation. Rappelons que l'inversion directe sur C(2) est impossible dans la série du galactose. Pour terminer, rappelons la synthèse des anhydrides de Brigl par époxydation des glycals avec le diméthylidioxirane exposée au paragraphe 3.4. On traitera d'un autre type d'addition, l'azidonitration, au paragraphe 10.3.3

Les composés hydroxylés — eau, alcools, phénols — ne s'additionnent pas sur la double liaison des glycals et de leurs esters en l'absence de catalyseurs acides. En revanche, à une température relativement élevée, ils produisent un déplacement de la fonction acétate en 3 des triacétylglycals, avec migration de la double

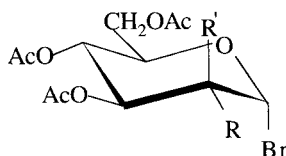


7.29 R=Ac

7.30 R=H

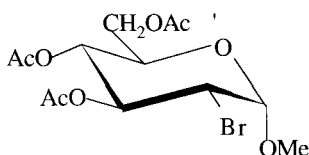


7.31

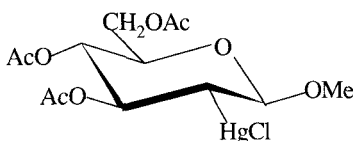


7.32 R=Br, R'=H

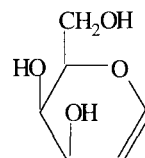
7.33 R=H, R'=Br



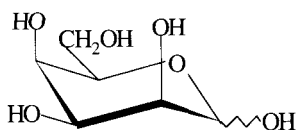
7.34



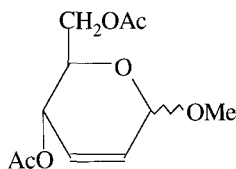
7.35



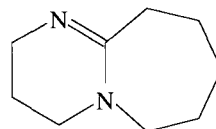
7.36



7.37



7.38

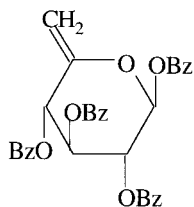


7.39

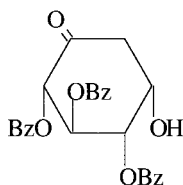
liaison à la position 2-3 selon **7.38**. Ainsi le méthanol conduit au méthyl 4,6-di-*O*-acétyl-2,3-didéoxy- α -D-érythro-hex-2-enopyranoside.

7.5.2 Réaction de Ferrier

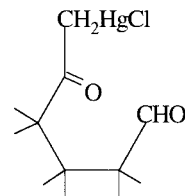
Nous avons rencontré ci-dessus des pyranoses avec une double liaison en C(1) – C(2) ou C(2) – C(3). On connaît des exemples de sucres avec des doubles liaisons sur toutes les autres positions. Nous nous bornerons à décrire une réaction importante des pyranoses non saturés en 5-6. On les prépare par élimination à partir des pyranoses 6-déoxy-6-iodo. Un article de 1988^[12] propose un traitement de 4 heures à 80° dans la DMF en présence d'une base non nucléophile, le DBU **7.39**, mais d'autres réactifs ont pu être utilisés antérieurement. En quelques heures de reflux dans l'acétone aqueuse en présence de chlorure mercurique, le tétrabenzoate **7.40** donne la cyclohexanone substituée **7.41**^[13]. Le produit de départ **7.40** est, comme le glucal, un éther vinylique. En opérant dans des conditions très modérées, on a pu mettre en évidence l'intermédiaire ouvert **7.42**, qui se cyclise ensuite comme un aldéhyde δ -cétonique^[14]. On a pu également réaliser la conver-



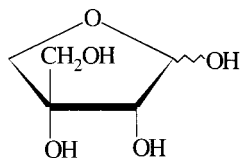
7.40



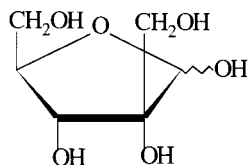
7.41



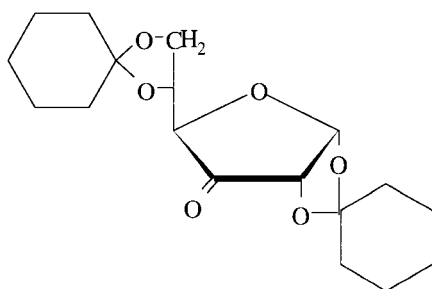
7.42



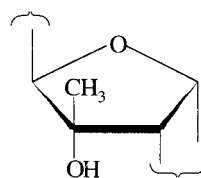
7.43



7.44



7.45



7.46

sion en cyclohexanone en remplaçant HgCl_2 par une quantité catalytique (relativement élevée, 10-20 mol %) d'acétate ou de chlorure de palladium^[12].

7.6 SUCRES RAMIFIÉS

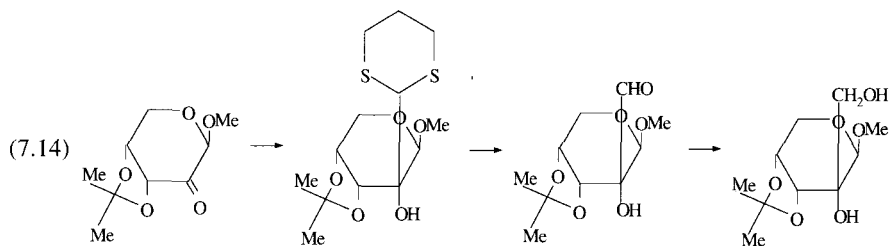
7.6.1 Généralités

Deux sucres ramifiés, l'apiose **7.43** et l'hamamélose **7.44**, sont très répandus dans le monde végétal. On en a isolé au moins une quarantaine d'autres comme constituants de molécules antibiotiques, ce qui a stimulé un effort synthétique important. La maîtrise des conditions de ramification semble indispensable si l'on veut utiliser les sucres comme matière première chirale. Il est commode de classer les sucres ramifiés en deux groupes. Dans le groupe le plus abondant, car c'est le plus facile à préparer, il y a un hétéroélément, le plus souvent l'oxygène d'un

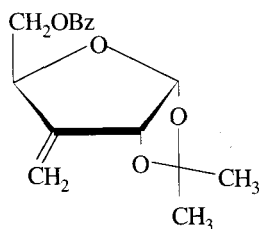
hydroxyle, au pied de la ramification, selon l'enchaînement $>C(OH) - R$. Dans l'autre groupe, il y a de l'hydrogène, selon l'enchaînement $>CH - R$ ^[15].

7.6.2 Famille $>C(OH) - R$

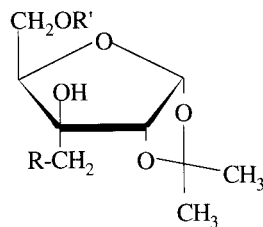
Les organométalliques s'additionnent de la façon habituelle sur les carbonyles des cycles furanose ou pyranose. Pour éviter le gaspillage de réactif, ou des précipitations indésirables en cours de réaction, il est souhaitable d'utiliser des protections éther ou acétal. La réaction est souvent stéréospécifique. Le diacétal **7.45** donne avec CH_3MgBr ou CH_3Li uniquement le produit α -D-*allo* **7.46** de l'attaque *exo*. Les réactions (7.14) illustrent quelques étapes de la synthèse de l'hamamélose qui comporte l'addition *exo* sur la cétone appropriée du dithiane lithié (78 %). La libération de la fonction aldéhyde par l'oxyde mercurique et le trifluorure de bore (75 %) est suivie d'une réduction par l'aluminiumhydruure de lithium (70 %). On observe des additions analogues avec d'autres nucléophiles carbonés, comme le cyanure, l'anion dérivé du nitrométhane, etc.



Une autre procédé de ramification utilise la réaction de Wittig. La condensation du sucre carbonyle avec le méthylènetriphénylphosphorane donne les sucres à double liaison exocyclique, comme le furanose **7.47**. La conversion en diol vicinal **7.48** par OsO_4 , suivie de la tosylation sélective de la fonction alcool primaire et de la réduction du sulfonate **7.49** par $LiAlH_4$ donne le produit final **7.50**. C'est un chemin contourné, mais qui aboutit à l'isomère *endo*. L'époxydation de la double liaison exocyclique par les peracides donne le « spiroépoxyde », qui peut



7.47

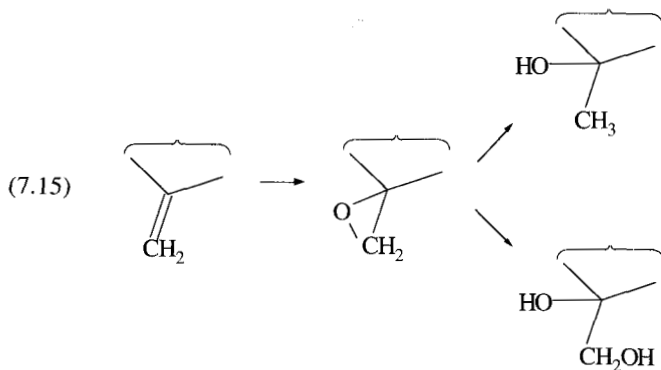


7.48 $R=OH$, $R'=Bz$

7.49 $R=OTs$, $R'=Bz$

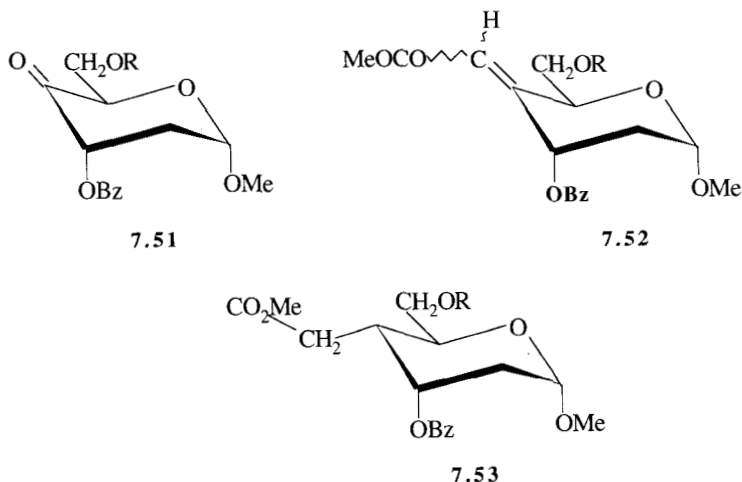
7.50 $R=H$, $R'=H$

être hydrolysé en glycol, ou réduit à son extrémité primaire (Réactions (7.15)). On obtient également un spiroépoxyde directement à partir du sucre carbonylé en le traitant par le diméthylsulfoxonium méthylure $\text{CH}_2 = \text{S}(\text{O})\text{Me}_2$. On a donc un vaste choix de voies d'accès à cette première famille, ce qui laisse espérer que l'une ou l'autre conduira à l'isomère désiré.



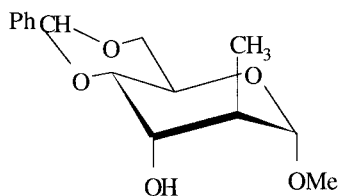
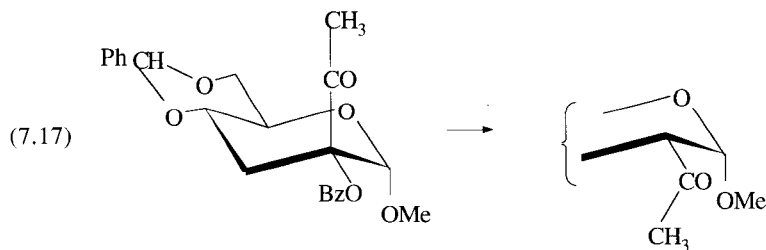
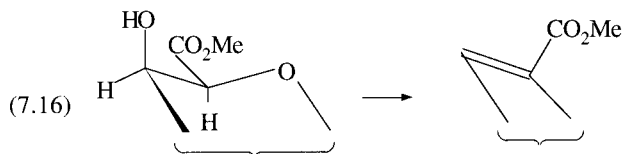
7.6.3 Famille >CH-R

La synthèse de ces produits prend de plus en plus d'importance, avec l'emploi croissant de séquences de sucres en synthèse totale. Il est rare que les séquences à préparer ne soient pas ramifiées. Une première solution consiste à hydrogéner catalytiquement les doubles liaisons exocycliques. Ainsi, la cétone **7.51** ($\text{R} = \text{Me}_3\text{CPh}_2\text{Si}$) aisément accessible à partir de 2-désoxyglucose, condensée avec le phosphonate $(\text{MeO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ (Réaction de Wittig-Horner) donne le produit à double liaison exocyclique **7.52**, qui est ensuite hydrogéné sur palladium sur charbon. On obtient le sucre ramifié **7.53** avec au moins 95 % de rende-



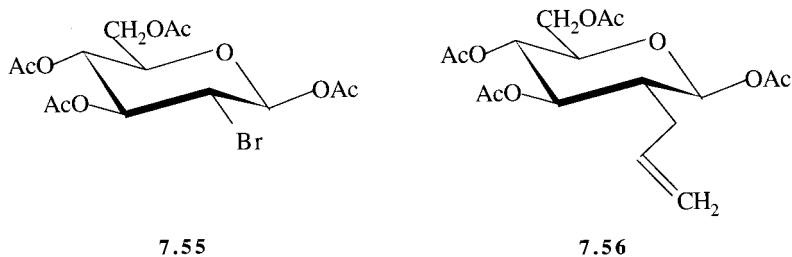
ment. La stéréospécificité vient des contraintes imposées par la structure polyfonctionnelle du pyranose et le volume du groupement R. Le produit **7.53** est un intermédiaire dans la synthèse du thromboxane B₂^[16].

Une autre voie d'approche est la désoxygénation de l'hydroxyle tertiaire au pied de la ramification. Parfois la configuration facilite une orientation sélective de la déshydratation endocyclique, donnant une double liaison réductible par la suite (7.16). On a aussi décrit la désoxygénation radicalaire d'un benzoate vicinal d'un carbonyle au moyen du tributylstannane (7.17). Dans ce cas, il y a inversion de configuration mais c'est peut-être un exemple isolé. Le résultat est sans doute lié à la configuration du radical intermédiaire porté par le carbone lié au benzoate. En tout cas, c'est une réduction radicalaire atypique. D'autres réactions introduisent directement la ramification >CH-R, par exemple l'ouverture des oxiranes par les nucléophiles carbonés. Le cuprate Me₂CuLi donne avec l'oxirane **7.18** le produit d'ouverture diaxiale **7.54**. On observe des réactions analogues avec les dialkylmagnésium (la présence d'un anion halogénure doit parfois être évitée), le cyanure Et₂AlCN et le malonate d'éthyle sodé.



7.54

Nous n'avons rencontré jusqu'à présent que des réactions ioniques dans la préparation des deux types de sucres ramifiés. On peut aussi introduire une ramifica-



tion du type $>\text{CH-R}$ par voie radicalaire. Par exemple, on traite le dérivé 2-bromo-2-désoxy **7.55** par l'allyltriphényl-stannane $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SnPh}_3$ dans le benzène à 80° et on entretient la réaction radicalaire en chaîne par addition lente (7 heures) d'azoisobutyronitrile, un amorceur classique de réactions en chaîne. On obtient ainsi le sucre ramifié **7.56**, mélangé à 10 % de son épimère en 2, mais isolable par cristallisation avec 39 % de rendement^[17]. Le mécanisme de la réaction en chaîne est donné sur la figure 7.1, où le sucre bromé **7.55** est représenté par RBr . L'amorceur le transforme en radical $\text{R}^\bullet$, qui s'additionne sur l'allylstannane. Le nouveau radical se fragmente en donnant le sucre ramifié $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ et le radical $\text{Ph}_3\text{Sn}^\bullet$, qui détache Br de RBr , et la réaction se poursuit^[18]. On a effectué des ramifications par cette méthode à d'autres positions que C(2) et avec d'autres accepteurs, comme l'acrylate de méthyle.

Enfin, on a préparé des sucres ramifiés par une réaction sigmatropique, le réarrangement de Claisen. Le chauffage à 180° de l'éther vinylique **7.57** donne le dihydropyrane **7.58**. La ramification est du même côté du cycle que la fonction éther vinylique du produit de départ et le réarrangement est strictement stéréospécifique. Ce type de réaction est utile en synthèse chirale, car le « sucre » final est désoxygéné sur trois positions, cependant la présence d'une double liaison

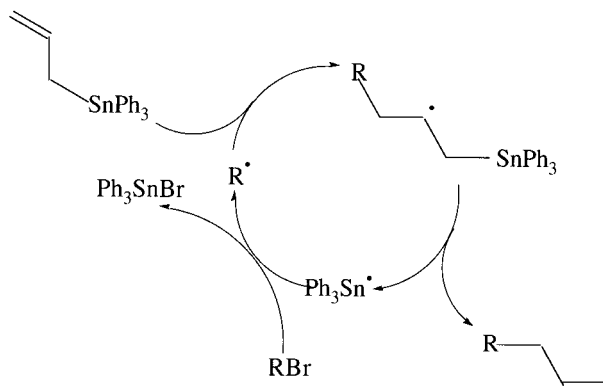
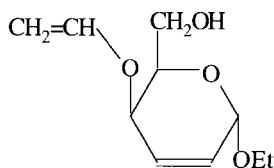
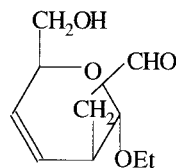


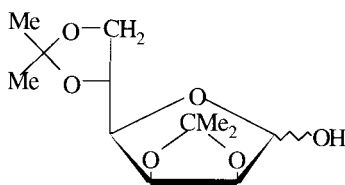
Figure 7.1 Mécanisme de la substitution radicalaire du tétra-*O*-acétyl-2-bromo-2-déoxy- β -D-glucopyranose.



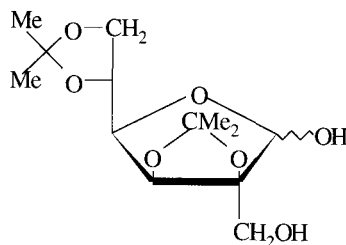
7.57



7.58



7.59



7.60

dans **7.58** laisse entrevoir des possibilités d'introduction d'hydroxyles, *cis* ou *trans* sur les carbones C(3) et C(4).

7.6.4 Condensation aldolique

C'est encore une réaction ionique, mais elle mérite une place à part. Elle peut conduire à des sucres des deux familles. La condensation d'un aldéhyde en α d'un carbonyle libre, dans des conditions alcalines modérées, semble toujours possible. Cette réaction très simple peut être très efficace. Ainsi le diacétal **7.59**, préparé quantitativement en traitant le mannose par l'acétone en milieu acide, est en équilibre avec le tautomère carbonylé. La condensation avec le formaldéhyde, utilisé en solution aqueuse, en présence de carbonate de potassium, donne le sucre hydroxyméthylé **7.60** avec 86 % de rendement^[19].

RÉFÉRENCES

- [1] A. Lubineau et H. Bienaymé, *Carbohydr. Res.*, 212 (1991) 267-271.
- [2] S. Hanessian et J. M. Vatile, *Tetrahedron Lett.*, 22 (1981) 3579-3582.
- [3] J. Alais et S. David, *Carbohydr. Res.*, 201 (1990) 69-77.
- [4] N. Baggett, « The Synthesis of Monosaccharides » dans *Carbohydrate Chemistry*, (sous la direction de J. F. Kennedy, chapitre 10), Oxford University Press, Oxford, 1988.
- [5] P. H. Gross, F. du Bois et R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.*, 4 (1967) 244-248.
- [6] C. Augé, S. David, C. Gautheron, A. Malleron et B. Cavayé, *New J. Chem.*, 12 (1988) 733-744.

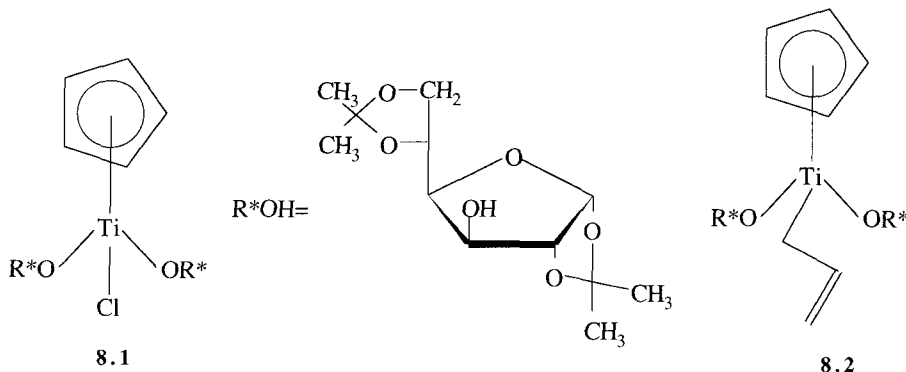
- [7] N. R. Williams, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 25 (1970) 109-179.
- [8] H. Paulsen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 26 (1971) 127-195.
- [9] R.W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2591-2.
- [10] R. J. Ferrier, « Unsaturated Sugars » dans *The carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, (sous la direction de W. Pigman et D. Horton), volume 1B, p. 844, Academic Press, New York, 2^e éd., 1980.
- [11] R. S. Tipson et H. S. Isbell, *Methods Carb. Chem.*, I (1961) 157-8.
- [12] S. Adams, *Tetrahedron Lett.*, 29 (1988) 6589-6592.
- [13] R. Blattner, R. J. Ferrier et P. Prasit, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1980) 944.
- [14] R. Blattner, R. J. Ferrier et S. R. Haines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, (1985) 2413-2416.
- [15] J. Yoshimura, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 42 (1984) 69-134.
- [16] S. Hanessian et P. Lavallée, *Can. J. Chem.*, 59 (1981) 870-877.
- [17] H. G. Korth, R. Sustmann, B. Giese, B. Rückert et K. S. Gröninger, *Chem. Ber.*, 123 (1990) 1891-1898.
- [18] B. Giese, *Radicals in Organic Synthesis : Formation of Carbon-Carbon Bonds* Pergamon Press, Oxford, New York, 1986.
- [19] P. T. Ho, *Can. J. Chem.*, 57 (1979) 381-383.

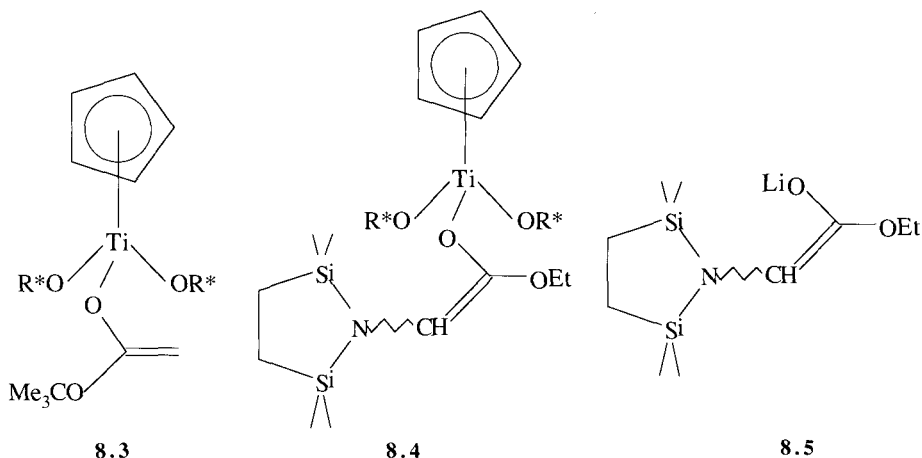
Les sucres en synthèse chirale

8.1 INDUCTION ASYMÉTRIQUE^[1]

8.1.1 Allylation et aldolisation énantiosélective

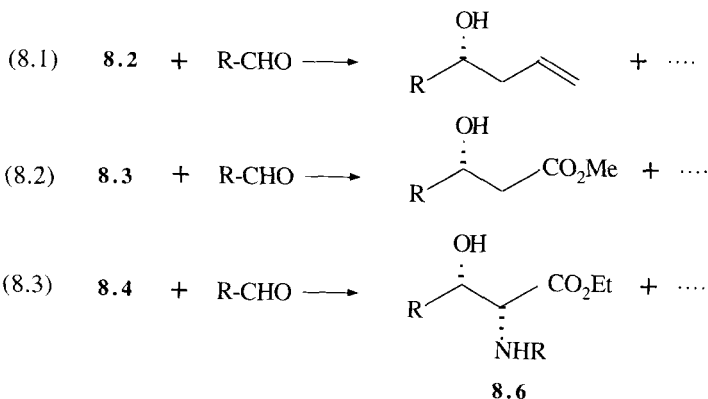
Les expériences que nous allons décrire mettent en jeu des réactifs chiraux construits à partir d'un titanocène^{[2] [3] [4] [5]}. Le produit de départ est le trichlorure de cyclopentadiényltitane, $C_5H_5TiCl_3$, que l'on prépare à partir du dichlorure $(C_5H_5)_2TiCl_2$ par chauffage avec $TiCl_4$. Ce trichlorure se combine à deux molécules de 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose (diacétone-glucose) en présence de triéthylamine et donne le *bis* titanate **8.1**. Celui-ci est un composé cristallisé ; on a donc pu déterminer sa structure à l'état solide. Il a la forme d'un tabouret de piano à trois pieds, dont le cyclopentadiényl serait le siège. Les deux ligands ont des orientations complètement différentes par rapport au cycle cyclopentadiényle. De ce fait, ils ménagent une cavité chirale autour de l'atome de titane. L'étude de **8.1** en solution par RMN n'indique ni inversion du centre métallique, ni échange rapide de ligands. Ceci suggère que la conformation en solution est voisine de la conformation dans le cristal. Le traitement de ce complexe par le chlorure d'allylmagnésium donne l'organométallique allyllitane **8.2**. Il semble que la cavité chirale du précurseur **8.1** soit encore présente dans **8.2**. On a préparé deux autres dérivés à partir du monochlorure **8.1** : l'énolate au titane **8.3**, en lui opposant le lithien $LiCH_2COOCMe_3$ dérivé de l'acétate de butyle tertiaire, et





l'énolate au titane **8.4**, en lui opposant le lithien du glycinate d'éthyle protégé sur la fonction amine **8.5**.

L'allyltitane **8.2** donne avec les aldéhydes l'alcool homoallylique (Réaction (8.1)). A -76° , l'addition a lieu préférentiellement sur la face *re* du carbonyle. La réaction a été conduite avec seize aldéhydes aliphatiques et aromatiques. La moyenne des excès énantiomériques mesurés sur les produits d'addition est de 90,5 %. L'énolate au titane **8.3** donne avec les aldéhydes un produit de condensation aldolique, un ester hydroxylé en β (Réaction (8.2)). L'excès énantiomérique moyen, mesuré à partir de treize exemples, est de 94 %. Finalement l'énolate du glycinate d'éthyle protégé **8.4** donne comme produit de condensation avec les aldéhydes des acides aminés hydroxylés en β **8.6** (Réaction (8.3)). Cette réaction conduit à des produits *D-thréo* avec deux centres de chiralité. Les excès diastéréoisomériques et énantiomériques moyens sont de 97 % et 96 %. Comme l'allylation, ces additions d'énolates (8.2) et (8.3) ont lieu préférentiellement sur la face *re* des aldéhydes. Il est raisonnable d'attribuer ces sélectivités énantiomériques à la coordination de l'aldéhyde dans la cavité chirale du complexe.

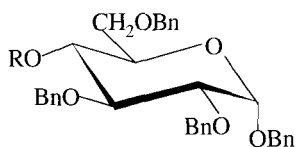


Dans toutes ces expériences, on récupère comme sous-produit un polymère du cyclopentadiényltitane $[(C_5H_5)Ti(OH)O]_n$ qui peut être reconverti en trichlorure et recyclé. L'autre sous-produit est le diacétone-glucose, également récupérable, mais en général de valeur négligeable par rapport au reste.

8.1.2 Cycloaddition

2,3-dihydro-6H-pyranes^[6]

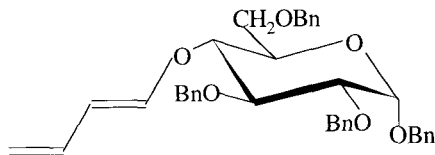
La cycloaddition du glyoxylate de butyle, $HCO-CO_2C_4H_9$, sur des éthers diéniques donne des 2,3-dihydro-6H-pyranes, substitués en 6 par un groupement alcoxy et en 2 par une fonction ester, que l'on peut considérer comme des analogues très réduits de pyranose^[6]. On peut préparer des éthers diéniques de sucres. La plus simple de ces préparations consiste en l'addition de l'oxygène de l'hydroxyle d'un sucre partiellement protégé, tel **8.7**, sur une des triples liaisons du butadiyne vendu sous une forme stabilisée, $Me_2C(OH)-C\equiv C-C\equiv C-C(OH)Me_2$. Cette addition donne l'éther **8.8** (mélange *cis-trans*), ensuite semi-hydrogéné en **8.9** (mélange *cis-trans*). Les deux constituants de ce mélange sont séparables. La cycloaddition du glyoxylate de butyle crée deux nouveaux centres de chiralité, et, compte tenu de la chiralité du sucre, quatre dihydropyranes diastéréoisomères. Il est commode de les désigner avec les conventions de la nomenclature des sucres, par α -D, β -D, α -L, β -L. Les proportions dans le mélange de dihydropyranes **8.11** obtenus dans la cycloaddition sur l'éther diénique *trans*



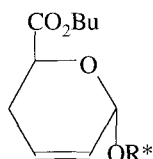
8.7 R=H

8.8 R= $CH=CH-C\equiv CH$

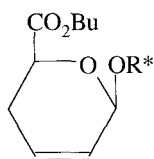
8.9 R= $CH=CH-CH=CH_2$



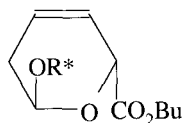
8.10



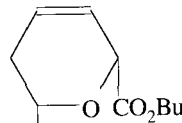
α -D



β -D

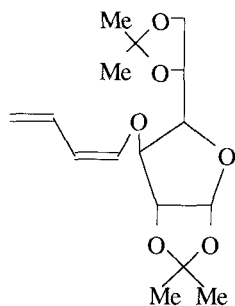


α -L

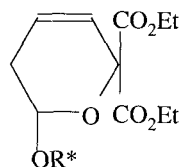


β -L

8.11



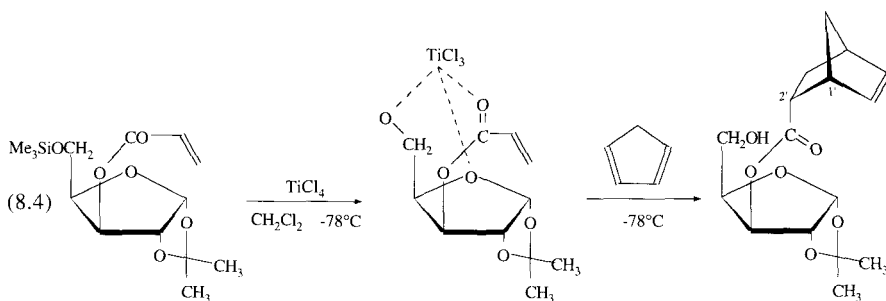
8.12



8.13

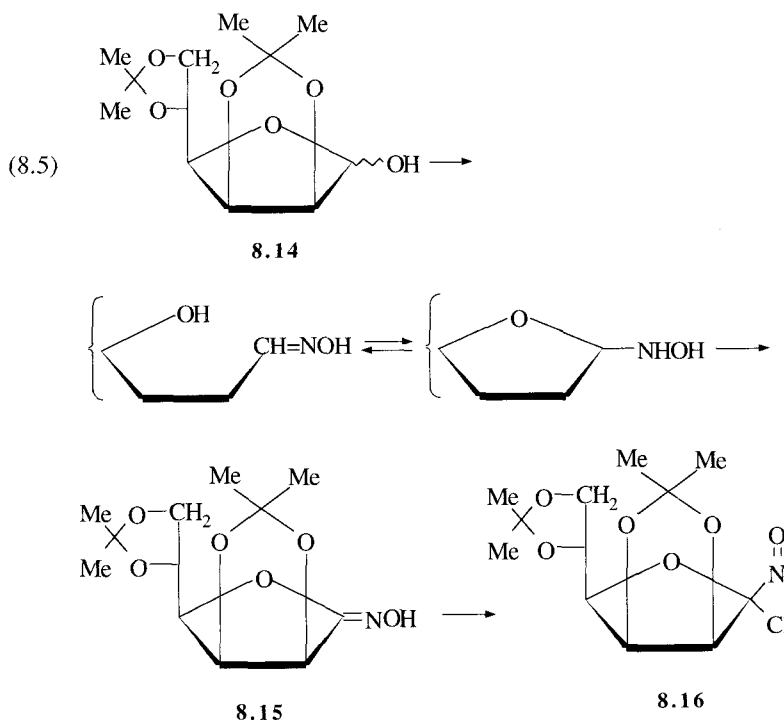
8.10 sont α -D (44 %), β -D (4 %), α -L (0 %) et β -L (52 %). Ces proportions correspondent à 56 % d'addition *endo*. Plus intéressant est le degré élevé de sélectivité faciale, la proportion d'addition sur la face *si* de l'éther diénylique, qui correspond à la somme (α -D) + (β -L), atteignant 96 %. Il y a donc un degré élevé de protection de la face *re* contre l'approche du diénophile par la molécule de glucose perbenzylé. Les configurations α -D et β -L seraient identiques si on avait utilisé un diénophile approprié. Effectivement, la cycloaddition du mésoxalate d'éthyle $\text{CO}(\text{CO}_2\text{Et})_2$ sur le diène *cis* **8.12** préparé à partir du diacétone-glucose donne, avec un rendement global de 85 % un mélange qui contient 92 % d'adduit *S*, **8.13**. Les dihydropyranes **8.11** et **8.13** et de nombreux analogues sont transformables en sucres pyranosiques authentiques par des fonctionnalisations convenables^{[7] [8]}.

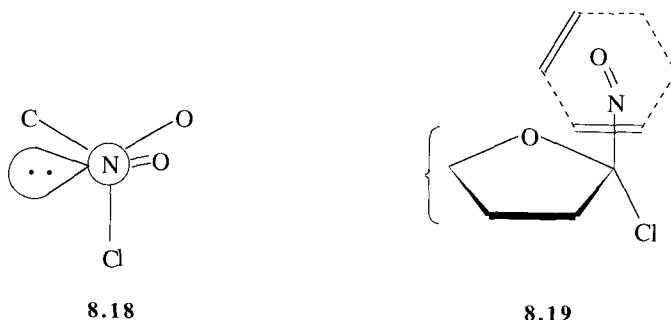
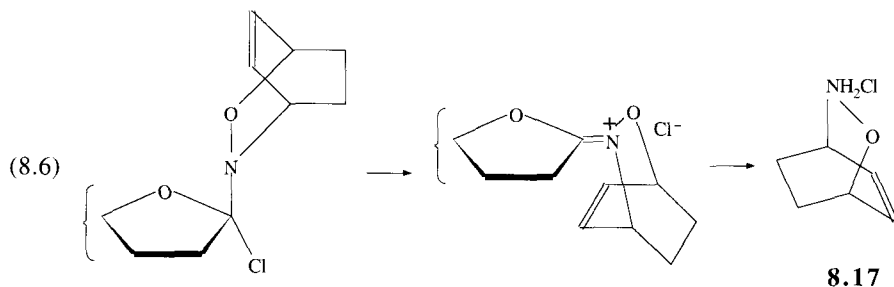
Ces premières cycloadditions n'étaient complètes qu'après 72 heures à 60°C. Lorsque les partenaires sont plus réactifs et qu'on peut catalyser la cycloaddition avec des acides de Lewis, on peut opérer à -78°C. Dans ces conditions, on observe éventuellement une induction asymétrique élevée : la réaction (8.4) du cyclopentadiène sur un acrylate dérivé du 5-*O*-triméthylsilyl- α -D-xylofuranose, conduite à -78°C dans le dichlorométhane en présence de TiCl_4 donne exclusivement l'adduit *endo* (1'*R*, 2'*R*). On explique ceci par la formation d'un complexe intermédiaire qui contient à la fois le diénophile et l'acide de Lewis attachés au sucre inducteur chiral^[9].



3,6-Dihydro-2H-1,2-oxazines^[10]

La cycloaddition [4 + 2] de diènes sur les dérivés nitrosés chlorés en α ouvre un accès facile aux 3,6 dihydro-2H-1,2-oxazines non substituées à l'azote. On a développé cette réaction à partir de composés nitrosés chlorés énantiomériquement purs dérivés de sucres. La préparation de l'un d'eux est schématisée selon (8.5). L'oxime du « diacétone-mannose » **8.14** est en équilibre tautomérique avec l'hydroxylamine cyclique. L'oxydation de cette hydroxylamine par le periodate de sodium à 80° dans des conditions légèrement basiques (acétate de sodium) donne l'hydroximinolactone **8.15**. On peut considérer **8.15** comme l'oxime d'un carbonyle d'ester. Le dérivé nitrosé chloré **8.16**, de couleur bleue, est finalement obtenu par chloration de **8.15** avec l'hypochlorite de butyle tertiaire. Le dérivé chloré nitrosé **8.16** est à la fois plus stable et beaucoup plus réactif que ses analogues aliphatiques simples. Avec les diènes les plus réactifs, comme le 1,3-cyclohexadiène, la réaction est terminée en moins de 15 mn à -70°. Avec le 2,4-hexadiène *trans, trans*, la réaction dure moins de 4 heures à -20°. On reconnaît la fin à la disparition de la couleur bleue de **8.16**. Le produit primaire de la cycloaddition du cyclohexadiène subit une quaternisation interne, donnant un produit qui est coupé par HCl (Réaction (8.6)) Dans cette expérience, qui conduit à **8.17**, comme avec les autres diènes symétriques, la dihydrooxazine est obtenue avec un excès énantiomérique au moins égal à 96 %.

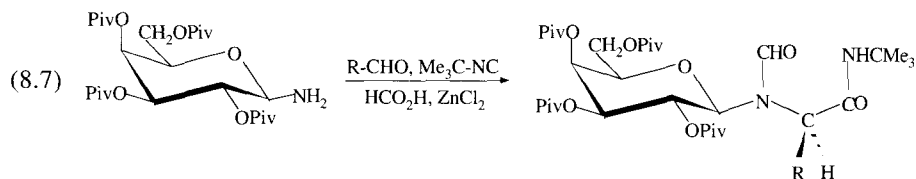




Dans le furanose **8.16** à l'état solide, le chlore adopte une orientation pseudo-axiale et l'azote une orientation pseudo-équatoriale. L'orientation de la liaison N-O est précisée par la représentation de Newman le long de la liaison C(1)-N, **8.18**. Un modèle compact indique qu'une face de N = O est très encombrée. Il est probable qu'il y a la même conformation en solution et que c'est ceci qui impose l'approche *endo* schématisée en **8.19**, où le cyclohexadiène cherche à éviter le support sucre du dérivé nitrosé chloré.

8.1.3 Réaction de Ugi

La réaction de Ugi est la synthèse de l'amide d'un acide α -aminé par action sur un aldéhyde d'une amine et d'un isonitrile, en présence de chlorure de zinc et d'acide formique. On a proposé comme partenaire aminé chirale un β -D-galactosylamine, dont les fonctions alcool sont protégées par estérification en pivalate (Réaction (8.7))^[11]. On conduit la réaction dans l'oxolane entre -75°C et -25°C . Le mélange diastéréomérique obtenu correspond à un rapport D/L voisin de 95 :5.



On obtient l'isomère D pur par une recristallisation dans l'heptane. On sait que la liaison entre sucre et azote est facile à couper dans les glycosylamines (voir le paragraphe 3.6.2).

8.2 LES SUCRES COMME PRÉCURSEURS DE SÉQUENCES DANS LES SYNTHÈSES DE PRODUITS NATURELS

8.2.1 Considérations générales

On peut faire la synthèse d'une substance naturelle à partir de précurseurs racémiques en utilisant des réactions stéréosélectives ou stéréospécifiques. Le produit final est un racémique et il faut achever la synthèse par un dédoublement optique. Cette voie d'approche semble passée de mode, au moins dans les laboratoires académiques. Une deuxième méthode repose sur la synthèse asymétrique. Les produits de départ sont racémiques, mais l'emploi de réactifs et de catalyseurs incorporant des structures chirales permet d'orienter à une ou plusieurs étapes privilégiées la route synthétique dans une voie chirale. Nous avons vu des exemples de tels réactifs au paragraphe 8.1 ci-dessus. La philosophie synthétique que nous allons développer maintenant repose sur l'emploi de matières premières chirales, généralement abondantes. Elle repose sur un corps de principes dont l'utilisation est facilitée par des programmes informatiques particuliers, groupés sous le nom de « méthode du chiron » (*the chiron approach*)^{[12] [13] [14]}. Le mot *chiron* a été forgé à partir de « synthon chirale ». On sait qu'en synthèse totale, le mot *synthon* désigne une petite molécule bâtie sur mesure pour s'encastrer exactement à sa place dans une synthèse totale multiétape. Le découpage en synthons de la cible (sur le papier !) est pratiqué aux sites où on peut espérer couder les morceaux dans l'avance synthétique. Ce sont en général les types de fonction présents dans la cible (et l'expérience passée du chimiste) qui orientent le découpage. Dans la « méthode chiron », le principe directeur est la conservation de la stéréochimie, on tâche de découper la cible synthétique avec une perturbation minimale des centres stéréogéniques. Naturellement, une deuxième condition intervient : les chiron à couder ensemble doivent être des produits naturels abondants ou facilement accessibles à partir de produits naturels abondants. Dans une certaine mesure, c'est cette facilité d'accès qui dicte la stratégie. Le coup d'œil du chimiste expérimenté n'est pas toujours suffisant pour reconnaître les précurseurs appropriés sur la molécule cible. Un programme informatique se propose d'aider à la reconnaissance de rapports cryptiques^{[12] [13] [14]}. D'abord, la molécule est présentée sous des aspects inhabituels, retournée, renversée, etc. D'une famille de composés à l'autre, les chimistes, suivis en cela par la presse spécialisée, adoptent des convention picturales différentes. Cette diversité de représentation ralentit le transfert mental entre les configurations de membres de familles chimiques différentes. Le programme permet de passer automatiquement d'une représentation conventionnelle à une autre. Ceci est illustré sur la figure 8.1. La donnée fournie

à l'ordinateur est la structure d'un composé naturel à forte activité, le FK506, dessinée d'une certaine façon, qui est la plus habituelle dans les périodiques, en haut à gauche. A partir de ce dessin, le programme donne la configuration absolue, *R* ou *S*, autour de chaque carbone. Il sectionne le grand cycle et aligne la chaîne sur un axe vertical, ce qui permet de passer à la représentation suivant la convention de Fischer (en haut à droite), familière aux spécialistes des sucres, ou à la représentation en zig-zag (en bas). La représentation Fischer est particulièrement com-

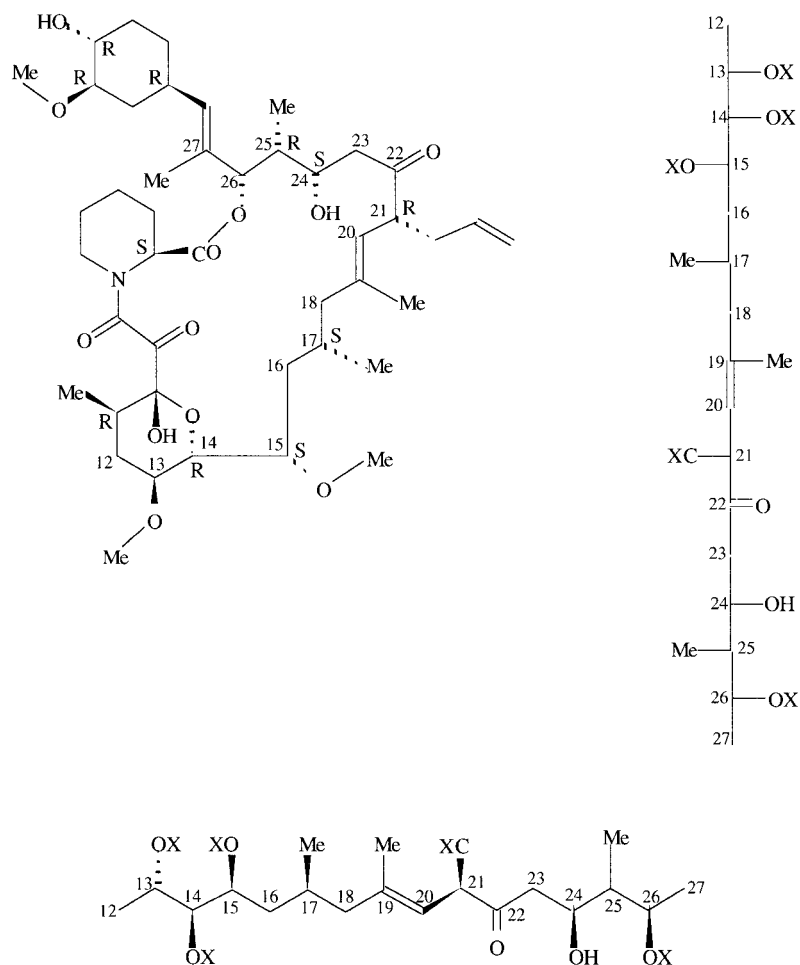


Figure 8.1 Attribution des symboles *R*, *S* et dessin de deux projections du composé FK 506 par le programme Chiron. D'après S. Hanessian, J. Franco et B. Larouche, *Pure Appl. Chem.*, 62 (1990) 1887-1910, S. Hanessian, *Ibid.*, 65 (1993) 1189-1204 et S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Product : The Chiron Approach*, Pergamon Press, 1983 (publié avec les aimables autorisations de l'International Union of Pure and Applied Chemistry).

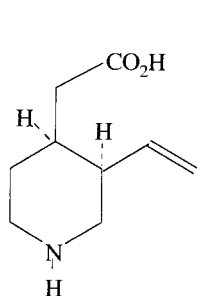
mode pour établir une corrélation avec les sucres. Le programme va plus loin et suggère des voies synthétiques au départ de « chiron » accessibles. Parfois la correspondance entre chiron et séquence de la cible n'est pas du tout évidente. Ainsi les sucres ont des fonctions alcool en trop et il faut les désoxygéner. Plus subtilement, il peut être profitable de conserver une fonction non présente dans la cible jusqu'à une étape tardive de la synthèse, parce qu'elle favorise la stéréosélectivité des réactions.

Depuis 1975, le rapport annuel de la Société Chimique d'Angleterre, *Carbohydrate Chemistry*, comporte un chapitre intitulé *Synthesis* [à partir de sucres] of *Enantiomerically Pure Non-Carbohydrate Compounds*.

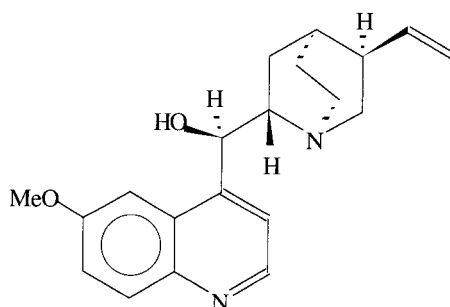
8.2.2 Synthèse à partir de sucres

(+)-Méroquinène^[15]

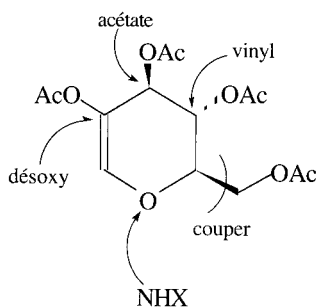
Cette pipéridine **8.20** a une relation évidente avec la quinine **8.21**, dont elle est un précurseur synthétique. Le précurseur est le composé **8.22**, peracétate d'un 2-hydroxyglucal. On a entouré le dessin **8.22** des indications sur les modifications nécessaires pour arriver au (+)-méroquinène. Le tétraacétate **8.22** est très facilement accessible, car c'est le produit d'élimination du bromure de tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle **8.23** par la base non nucléophile, 1,5-diazabicyclo [5.4.0]



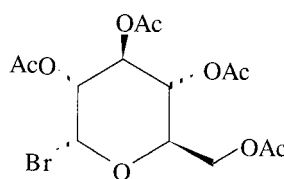
8.20



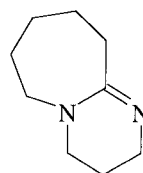
8.21



8.22

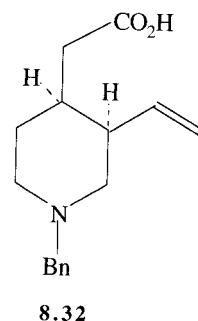
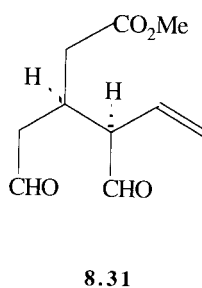
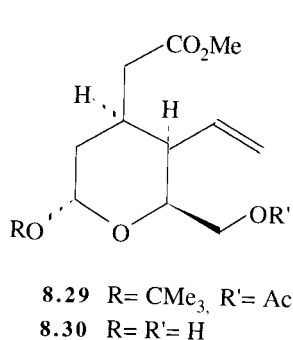
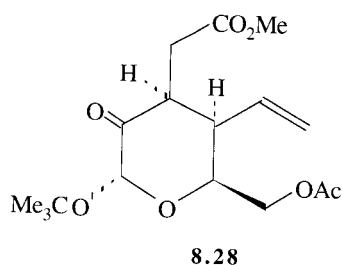
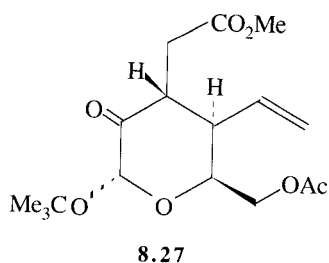
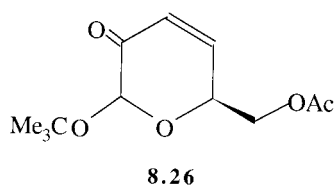
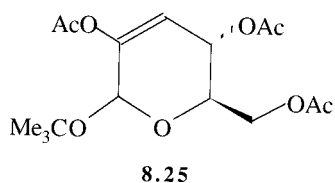


8.23



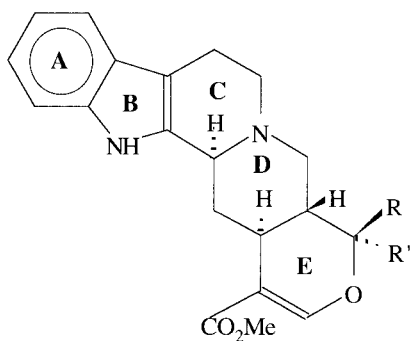
8.24

undéc-5-ène (DBU ; **8.24**). Il se comporte strictement comme le glycal en présence d'un alcool et d'éthérate de trifluorure de bore : le réarrangement donne le glycoside non saturé **8.25**, qui est comme **8.22**, un acétate d'énol. L'hydrolyse alcaline libère l'énolate dont le tautomère cétonique subit aisément une élimination d'acétate sur les positions 3-4. En réacétylant, on obtient **8.26**. A ce stade, le lecteur remarquera que **8.26** ne contient aucun des deux centres stéréogéniques de la cible. Il n'y a plus que deux carbones asymétriques et, comme on va le voir, tous les deux destinés à disparaître dans la synthèse. Mais c'est grâce à leur présence à ce stade que les deux centres chiraux définitifs vont s'établir. L'addition de Michaël du vinylcuprate modifié, $(\text{CH}_2=\text{CH})\text{CuCN}(\text{MgBr})_2$, donne un énolate sur lequel on fait instantanément réagir le bromoacétate de méthyle. Ceci donne presque exclusivement l'isomère *trans* **8.27**, isomérisé en *cis* **8.28** par la triéthylamine. La suite des opérations comporte la désoxygénation en C(2), **8.29**, l'hydrolyse des protections, **8.30** et le clivage du diol 5,6 par le periodate. La condensation du dialdéhyde **8.31** avec la benzylamine, suivie de réduction par le cyanoborohydrure au pH 4.3 donne la pipéridine **8.32**.



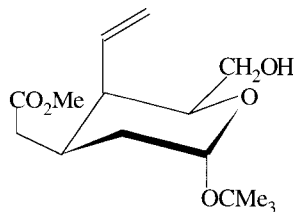
(-) *Ajmalicine* (8.33) et (+)-*19-épi*ajmalicine (8.34)^[16]

Ces deux alcaloïdes indoliques ont des propriétés pharmacologiques importantes. Le point de départ est l'intermédiaire **8.29** déjà employé à la synthèse du (+)-méroquinène. On hydrolyse la fonction acétate par méthanolyse alcaline, ce qui donne l'alcool primaire **8.35**. Nous revenons ici passagèrement au mode de représentation traditionnel des pyranoses pour mettre en évidence l'orientation axiale du groupement vinyle. On désoxygène le carbone 6 en remplaçant d'abord l'hydroxyle par du chlore, au moyen du système $\text{PPh}_3\text{-CCl}_4$, et on réduit ensuite le chlorure par voie radicalaire avec le tributylstannane. L'étape suivante est l'ozonisation du groupement vinyle en aldéhyde **8.36**, axial. Traité par la base **8.24**, le substituant -CHO adopte la position stable équatoriale **8.37**. Le couplage avec la tryptamine **8.38** en présence de réducteur (NaBH_4) donne **8.39** où l'on reconnaît les cycles **ABDE** des deux alcaloïdes cibles. Dans cette réaction, la base de Schiff entre l'amine et l'aldéhyde est réduite en amine secondaire ; cette dernière est cyclisée en amide cyclique par la fonction ester. Sans donner plus de détails, notons que ce carbonyle amidique est en bonne place pour permettre une cyclisation sur le carbone α de l'azote indolique, fermant ainsi le cycle **C**. L'introduction du substituant CO_2Me sur le cycle **E** nécessite la conversion du glycoside en lactone **8.40**, que l'on peut déprotoner en α avec la base Et_2NLi . La

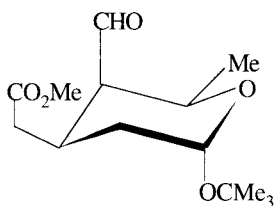


8.33 R = H, R' = Me

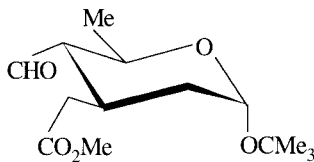
8.34 R = Me, R' = H



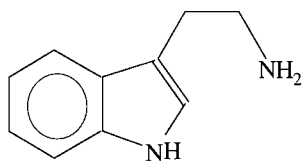
8.35



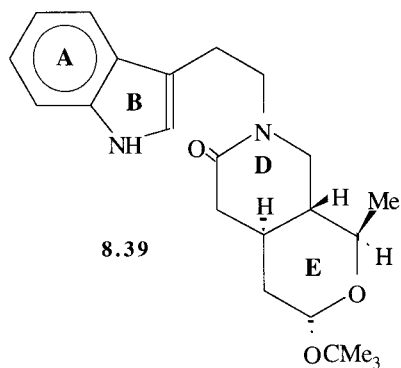
8.36



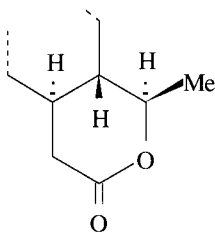
8.37



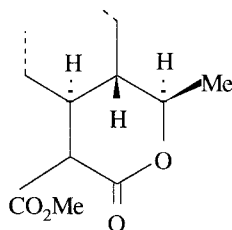
8.38



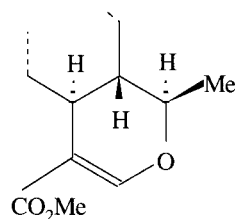
8.39



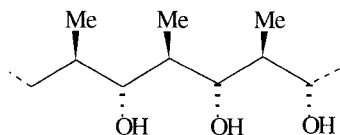
8.40



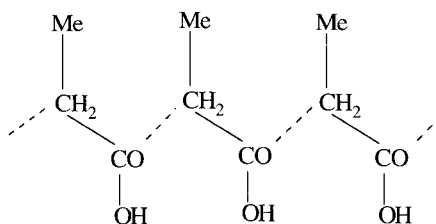
8.41



8.42



8.43



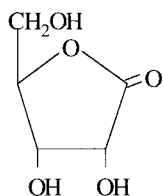
8.44

condensation de l'anion avec CNCO_2Me donne **8.41**, qui est réduit en **8.42** par l'hydruide de diisobutylaluminium. L'orientation du méthyle de **8.42** correspond à celle de l'alcaloïde *epi*. Pour la (-)-ajmalicine, il faut épimériser au niveau de C(5) du sucre, à une étape convenable. La méthode repose sur l'ouverture de la lactone, qui libère la fonction alcool sur C(5). Celle-ci est alors inversée.

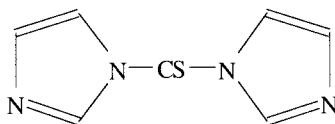
Substances naturelles d'origine polypropionique

Sur la molécule d'un certain nombre de substances naturelles, souvent antibiotiques, on observe des séquences constituées par une chaîne carbonée linéaire sur laquelle alternent les ramifications méthyle et hydroxyle comme sur le fragment

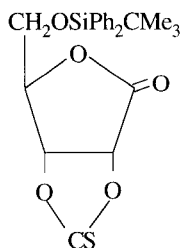
8.43. La plupart dérivent sans doute de la condensation de formes biologiquement activées de l'acide propionique selon **8.44**. On rencontre aussi les séquences désoxygénées. Pour construire ces séquences à partir d'enchaînement de sucres, un des problèmes est l'introduction stéréospécifique de ramifications méthyle. Un chiron possible est la D-ribonolactone **8.45**. La protection sélective de la fonction alcool primaire et la dérivation du système diol avec le thiocarbonyl bis imidazole **8.46** donnent le thionocarbonate **8.47**. Le traitement de **8.47** au nickel de Raney produit une élimination et conduit à la lactone non saturée **8.48**. L'addition de Michaël du réactif volumineux $(\text{MeS})_3\text{CLi}$ a lieu en *trans* de C(5). On oxyde directement l'énolate avec un peroxyde du molybdène et, là encore, un facteur d'encombrement introduit l'hydroxyle stéréospécifiquement en *trans*, donnant en une seule opération **8.49**. Le substituant soufré est réduit en méthyle par le nickel de Raney. On a ainsi introduit spécifiquement la ramification carbonée. De là on passe à **8.50** par des transformations classiques. Nous avons porté la numérotation de la ribonolactone pour permettre au lecteur de suivre les avatars du sucre. On



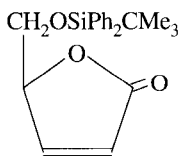
8.45



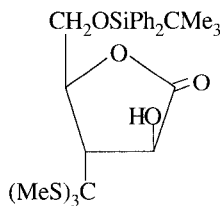
8.46



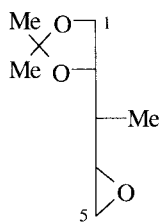
8.47



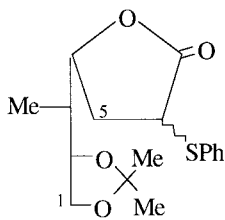
8.48



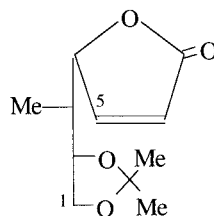
8.49



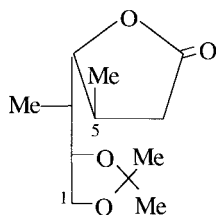
8.50



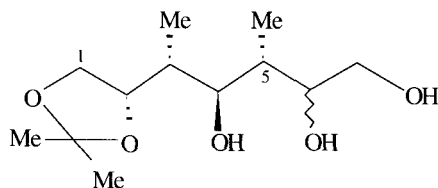
8.51



8.52



8.53



8.54

ouvre l'époxyde avec l'organolithien bifonctionnel $\text{LiCH}(\text{SPh})\text{CO}_2\text{Li}$. Ceci introduit une fonction acide carboxylique, qui est lactonisée sur la fonction alcool secondaire provenant de l'ouverture de l'époxyde. On obtient la lactone **8.51**. La fonction phénylthio est en place pour permettre l'introduction de la double liaison par élimination de sulfoxyde. Le produit, **8.52**, est un analogue de **8.48**, sauf que la chaîne latérale a l'orientation opposée. Aussi, c'est toujours en *trans* de cette chaîne latérale qu'a lieu l'addition de Michaël. Le méthyllithium donne le produit ramifié **8.53**. Comme précédemment, on peut oxyder *in situ*. Après ouverture réductrice du cycle lactonique par LiAlH_4 , on arrive à **8.54**, précurseur d'une séquence de l'ionomycine^[17].

RÉFÉRENCES

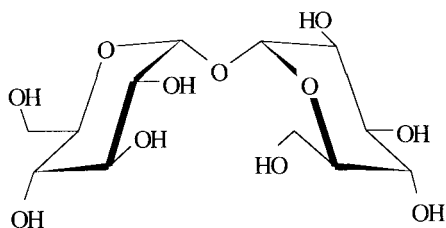
- [1] H. Kunz et K. Rück, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32 (1993) 336-358.
- [2] M. Riediker et R. O. Duthaler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28 (1989) 494-495.
- [3] R.O. Duthaler, P. Herold, W. Lottenbach, K. Oertle et M. Riediker, *Ibid.*, 495-497.
- [4] G. Bold, R. O. Duthaler et M. Riediker, *Ibid.*, 497-498.
- [5] M. Riediker, A. Hafner, U. Piantini, G. Rihs et A. Togni, *Ibid.*, 499-500.
- [6] A. Zamojski, A. Banaszek et C. Gryniewicz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40 (1982) 1-112.
- [7] S. David, A. Lubineau et A. Thiéffry, *Tetrahedron*, 34 (1978) 299-304.
- [8] S. David, J. Eustache et A. Lubineau, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1979) 1795-1798.
- [9] H. Kunz, B. Müller et D. Schanzenbach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26 (1987) 267-269.
- [10] H. Felber, G. Kresze, R. Prewé et A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 69 (1986) 1137-1146.
- [11] H. Kunz et W. Pfengle, *Tetrahedron*, 44 (1988) 5487-5494.
- [12] S. Hanessian, J. Franco et B. Larouche, *Pure Appl. Chem.*, 62 (1990) 1887-1910.
- [13] S. Hanessian, *Ibid.*, 65 (1993) 1189-1204.
- [14] S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products : The Chiron Approach*, Pergamon Press, 1983.
- [15] S. Hanessian, A. M. Faucher et S. Léger, *Tetrahedron*, 46 (1990) 231-243.
- [16] S. Hanessian et A. M. Faucher, *J. Org. Chem.*, 56 (1991) 2947-2949.
- [17] S. Hanessian et P. J. Murray, *Tetrahedron*, 43 (1987) 5055-5072.

Les oligosaccharides : Configuration et analyse

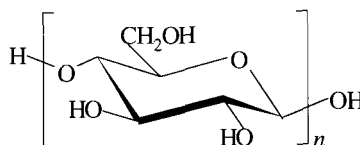
9.1 INTRODUCTION, NOMENCLATURE

Les molécules rencontrées jusqu'ici dérivait en général d'un seul sucre simple, pentose, hexose, etc. Nous les avons appelées sucres, ce qui est correct, mais il va falloir désormais les différencier d'autres sucres, bâtis à partir de deux, trois, quatre... ou un très grand nombre de sucres simples. C'est le moment d'introduire les termes, à la signification évidente, de monosaccharide, di-, tri-, tétrasaccharide,... polysaccharide. Les unités monosaccharidiques sont reliées par des ponts oxygène, qui se présentent comme le résultat de la substitution de l'hydroxyle hémiacétalique de l'une d'elles par l'oxygène d'un hydroxyle lié à l'autre. Si ce dernier est également hémiacétalique, ces deux fonctions se bloquent réciproquement, il n'y a plus d'aldéhyde potentiel. La disparition du pouvoir réducteur était déjà facile à reconnaître avec les moyens de l'ancienne chimie ; elle a servi très tôt de base à la classification. Comme disaccharide non réducteur, nous avons déjà rencontré le sucre ordinaire **3.21**. Les tréhaloses sont les trois disaccharides non réducteurs bâtis uniquement à partir d'unités D-glucopyranosyle, donc avec les configurations anomériques fixées α, α ; α, β et β, β . Le plus commun est l'isomère α, α , **9.1**, substance de réserve chez les invertébrés et les végétaux inférieurs.

Dans l'autre type de liaison, l'oxygène du pont provient d'un hydroxyle alcoolique. On l'a rencontrée dans une multitude de produits naturels. Elle permet la formation d'enchaînements de petite ou grande dimension, que le chimiste polymériste appellerait des oligomères et polymères de polycondensation. Il reste toujours à un bout de ces chaînes une fonction aldéhyde potentielle, d'où le nom d'*extrémité réductrice* qu'on lui donne par abus de langage, même si elle ne l'est pas du tout, parce qu'elle est engagée dans une liaison glycoside avec une molécule n'appartenant pas à la famille des sucres. Les très longues chaînes sont périodiques. Pour l'amylose, **11.14**, et la cellulose, **9.2**, la période est d'une unité monosaccharidique D-glucopyranosyle, liée en 1 et 4. Les configurations anomériques sont toutes α pour l'amylose et toutes β pour la cellulose. Mais on rencontre aussi des portions de chaînes périodiques, plus ou moins longues, où l'unité répétitive est un disaccharide, comme dans certains glycolipides ou l'héparine



9.1



9.2

et les polysaccharides apparentés, ou même un tri-, un tétrasaccharide comme dans les antigènes bactériens. Depuis une vingtaine d'années, on a été amené à attacher une importance particulière à une classe de molécules intermédiaires appelées de façon imprécise les *oligosaccharides* : ce nom recouvre tous les degrés de condensation, depuis deux jusqu'à un maximum mal défini, une vingtaine peut-être d'unités mono-saccharidiques. Ce classement n'est pas dicté par la chimie, mais par l'activité fréquemment observée de certains représentants dans les phénomènes de reconnaissance. Il n'y a aucune régularité évidente dans ces édifices, auxquels la suite de cet ouvrage sera désormais presque uniquement consacrée.

Dans la nomenclature préconisée, un oligosaccharide est un composé dont l'hydrolyse complète donne un nombre restreint de monosaccharides. Un disaccharide non réducteur est décrit comme un glycosylglycoside. Exemples : Sucre ordinaire ou saccharose, **3.21** : β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside ; Tétrahalo- α , α , **9.1** : α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside.

Un disaccharide réducteur est décrit comme un glycosylglycose, l'unité non réductrice considérée comme un substituant de l'autre : N-Acétillactosamine (voir la formule **9.9**, R = H, R' = OH, $n = 1$) : 2-Acétamido-2-déoxy-4-O- β -D-galactopyranosyl-glucose.

On *dessine* en général les chaînes non ramifiées de l'extrémité non réductrice, à gauche, à l'extrémité réductrice, à droite. Une nomenclature, plus parlante que la précédente, *écrit* les unités monosaccharidiques dans le même sens, la liaison glycosidique étant décrite par le symbole ($n \rightarrow m$), avec $n = 1$ ou 2. La N-acétillactosamine s'écrit alors : O- β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-déoxy-D-glucose.

Le tétrasaccharide glycoside étudié au paragraphe 11.5.3 s'écrit : 4-nitrophényl O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopyranoside.

On note les ramifications d'unités monosaccharidiques sur la chaîne principale par un système de crochets.

Ces deux nomenclatures sont les seules qui permettent d'indiquer avec clarté la position des substituants sur les monosaccharides constitutifs et ce sont celles qu'on rencontre dans les articles de chimie synthétique en particulier. Elles sont

Biochimie	Nomenclature précise
Glc α (β)	α (β)-D-Glc <i>p</i>
Gal α (β)	α (β)-D-Gal <i>p</i>
Fuc α (β)	α (β)-L-Fuc <i>p</i>
GlcNAc α (β)	α (β)-D-GlcNAc <i>p</i>
GalNAc α (β)	α (β)-D-GalNAc <i>p</i>
NeuAc α (β)	α (β)-D-Neu 5Ac <i>p</i>

Tableau 9.1 Traduction en nomenclature précise des noms de résidus monosaccharidiques employés en biochimie.

encombrantes et on peut simplifier pour les oligosaccharide libres. Chaque monosaccharide est représenté par un symbole : glucose : Glc ; galactose : Gal ; mannose : Man ; fucose : Fuc ; *N*-acétyl-glucosamine : GlcNAc ; *N*-acétyl galactosamine : GalNAc ; acide sialique (le plus commun) : NeuAc. La dimension du cycle est précisée par l'adjonction de *p* ou *f*. La *N*-acétyllactosamine et le tétrasaccharide libre s'écrivent alors :

β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc et α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc

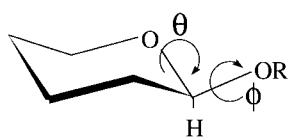
Parmi les biochimistes, ceux qui rencontrent dans leurs études un nombre limité de sucres, tous sous la forme pyranosique, emploient dans leurs articles une nomenclature encore plus simple. Ils suppriment D, L, *p* et *f* et rejettent le descripteur d'anométrie après le symbole du sucre, ce qui donne, pour la *N*-acétyllactosamine :

Gal β (1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc

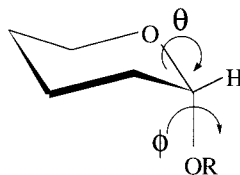
Si devant une formule de ce style, le lecteur ressent un besoin de précision, il pourra se reporter au tableau 9.1 pour la traduire en nomenclature sans ambiguïté.

9.2 EFFET EXOANOMÉRIQUE

Les oligosaccharides sont bâtis à partir de résidus monosaccharidiques reliés par des ponts oxygène. Est-ce que cette articulation est bloquée ou semi-bloquée ; y a-t-il libre rotation autour des deux liaisons simples carbone-oxygène ? A vrai dire, ce problème se pose déjà avec les glucosides simples (voir le chapitre 3), mais nous l'examinerons ici parce que c'est dans le cadre de la chimie des oligosaccharides qu'il a soulevé le plus d'intérêt. On comprendra qu'il est très important de savoir si ces molécules forment un ensemble souple ou semi-rigide pour comprendre le mécanisme de la reconnaissance cellulaire. Dans le cas général, la conformation autour d'une liaison simple est *gauche* (ou *synclinale*, *sc*) ou *anti-périplanaire* (*ap*). Dans la région anomérique on prend comme référence la liaison



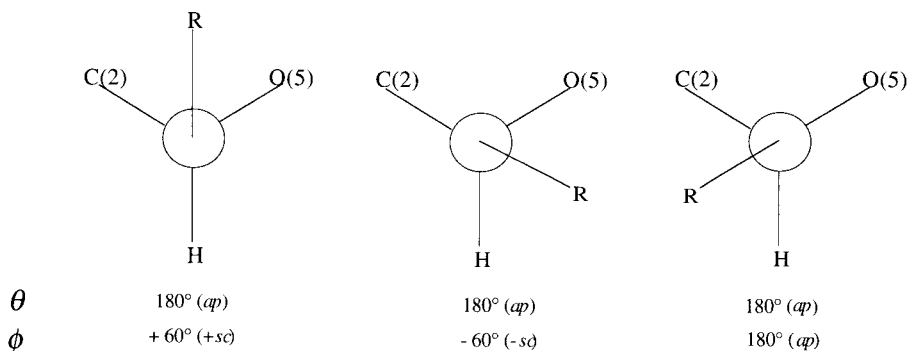
9.3e



9.3a

C(1) - O(5) et les conformations sont précisées par la connaissance des angles dièdres $\theta = \text{O}(1) - \text{C}(1) - \text{O}(5) - \text{C}(5)$ et $\phi = \text{R} - \text{O}(1) - \text{C}(1) - \text{O}(5)$, avec les conventions de notation des cristallographes. Dans le pyranoside en conformation idéale, l'anomère équatorial, **9.3e** correspondant à $\theta = 180^\circ$ (*ap*) et l'anomère axial, **9.3a** à $\theta = +60^\circ$ (*+sc*). On voit sur la figure 9.1 les trois conformations de chaque anomère à considérer *a priori*^[1].

Anomère équatorial



Anomère axial

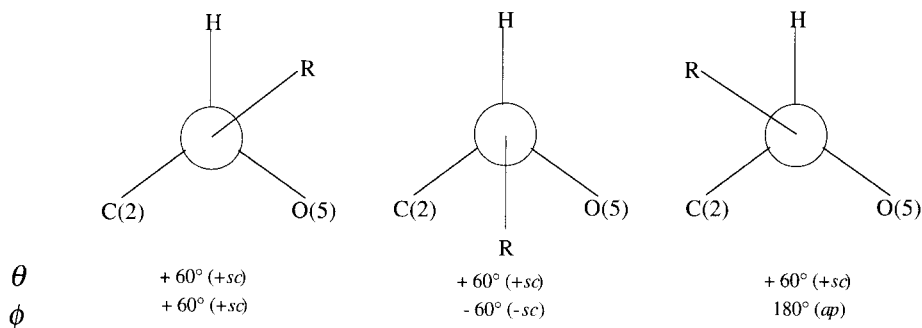


Figure 9.1 Conformations à considérer pour deux glycosides anomériques.

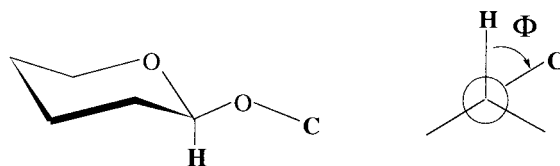


Figure 9.2 Les atomes C et H dont on mesure le couplage vicinal, à droite, projection de Newman suivant C(1) - O(1).

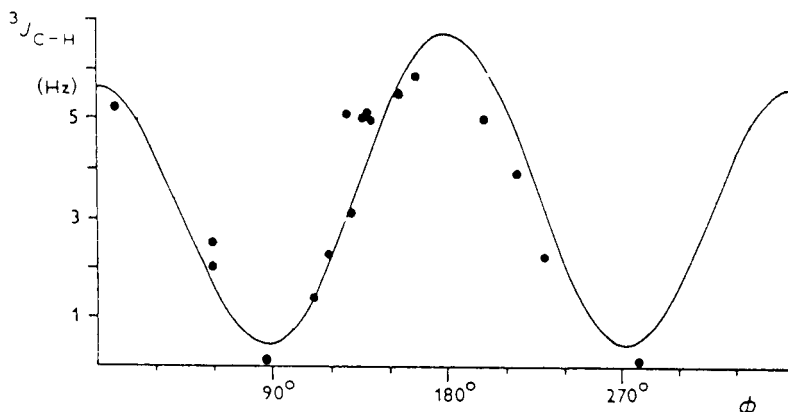


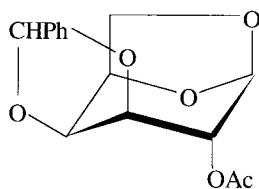
Figure 9.3 Dépendance du couplage $^3J_{CH}$ de l'angle dièdre Φ défini sur la figure 9.2 (publié avec l'aimable autorisation d'Elsevier Science).

On mesure évidemment sans difficulté θ et ϕ par les rayons X sur les échantillons cristallisés, mais c'est exceptionnel d'en obtenir avec les oligosaccharides. N'importe comment, cela ne donne pas de certitude sur la conformation en solution, c'est-à-dire dans les conditions où ils manifestent réellement leur activité. Les mesures en solution utilisent la RMN de ^{13}C , qui permet de déterminer le couplage 3J entre le proton anomérique et l'atome de carbone de jonction de la molécule glycosidée (Fig. 9.2). On a établi expérimentalement la relation entre $^3J_{CH}$ et Φ à partir de dérivés de sucres présumés très rigides, tel que 9.4. Il est alors vraisemblable que les angles dièdres considérés sont peu modifiés par le passage en solution. Les mesures sont bien représentées par la formule (9.1), qui donne graphiquement une courbe du type Lemieux-Karplus^[2] (Fig. 9.3) :

$$(9.1) \quad ^3J_{CH}/\text{Hz} = 5,7 \cos^2\Phi - 0,6 \cos \Phi + 0.5$$

On peut aussi évaluer la proximité de ces atomes carbone et hydrogène par mesure du temps de relaxation spin-réseau de ce proton^[3].

On trouve que les glycosides axiaux existent uniformément sous la conformation (+ sc, + sc). Par exemple dans le tréhalose, α , 9.1, les quatre angles dièdres



9.4

anomériques correspondent à $+sc$ et le disaccharide possède un axe C_2 , aussi bien en solution qu'à l'état solide. Par contre, les glycosides équatoriaux connus se répartissent en deux groupes, l'un majoritaire $ap, -sc$ (trois contre un) et l'autre minoritaire, ap, ap . On peut se demander si ces préférences conformationnelles sont dues à autre chose que des interactions non liées. Les conformations interdites ap, sc et $+sc, -sc$ amènent la molécule substituant sur O(1) dans une position d'étroite proximité avec les surfaces inférieure ou supérieure du pyranose. La préférence pour $ap, -sc$ et $+sc, +sc$ tiendrait simplement au fait que l'oxygène cyclique est moins encombrant que le carbone tétraédrique C(2). Lorsqu'on prend, sur un très grand nombre d'exemples, la moyenne des valeurs de ϕ — qui sont d'ailleurs fort dispersées — on observe les conformations données à la figure 9.4.

Ceci peut traduire une tendance de l'orbitale $2p$ de l'oxygène à s'aligner sur la liaison C(1) - O(5) de façon à interagir avec l'antiliante correspondante. Mais plus simplement, on peut juger que le groupe R se rapproche naturellement de l'hydrogène, le groupe de loin le moins volumineux. Comme d'habitude, on peut reprocher aux mesures de RMN de ne traduire qu'une moyenne entre plusieurs conformations. Ce qui compte évidemment, c'est d'évaluer les barrières. Il y a eu beaucoup de calculs sur des modèles simples. Peut-être la leçon à en tirer est-elle qu'on ne peut pas considérer qu'angles et longueurs de liaison varient indépendamment les uns des autres, donc chaque modèle doit être optimisé.

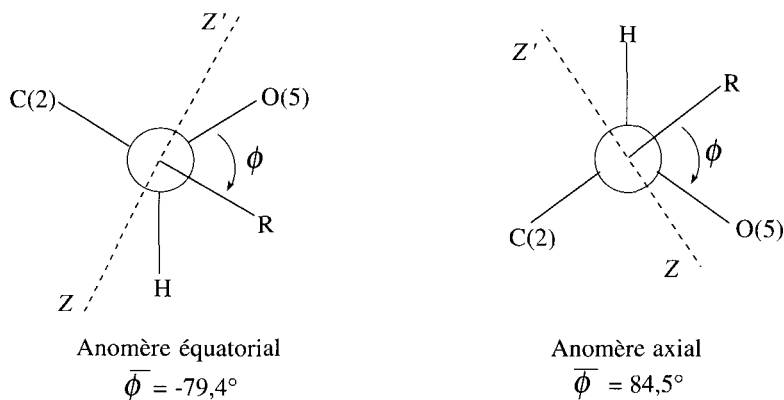


Figure 9.4 Moyenne des conformations exoanomériques observées.

9.3 DÉTERMINATION DES SÉQUENCES PAR LES MÉTHODES CHIMIQUES

9.3.1 Hydrolyse acide

La première question concerne la nature et les proportions relatives des monosaccharides constitutifs. On y arrive en principe par hydrolyse acide^[4] mais, dans la pratique, il faut l'appliquer avec discernement car il y a un certain nombre de cas d'espèce importants. On emploie les acides chlorhydrique, sulfurique et trifluoroacétique, dont les solutions N ont respectivement les pH 0,1 – 0,3 – 0,7. Lorsque l'hydrolyse libère des monosaccharides fragiles en milieu acide, il y a un équilibre délicat à maintenir entre les risques d'hydrolyse incomplète et de destruction partielle du produit d'hydrolyse. Les sucres fragiles sont les pentoses, les désoxysucres, les acides uroniques et aldoniques. Lorsque l'acide sialique est maintenu 30 mn à 90° dans HCl 0,01 M, il y a 20 % de décomposition. Avec les polysaccharides neutres, on peut limiter la décomposition à moins de 9 %. Les groupements acétylés des acétamides sont hydrolysés et on obtient les amino sucres protonés, qui sont relativement stables.

L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique méthanolique, qui conduit aux méthyl glycosides serait moins destructrice, mais, dans le pire des cas, un monosaccharide peut se retrouver dans le « méthanolysat » sous quatre formes chimiques différentes, les quatre méthyl glycosides. L'acétolyse, c'est-à-dire la dégradation par un mélange d'anhydride acétique et d'acide sulfurique transforme la cellulose en octoacétate du disaccharide β -D-Glcp-(1→4)-Glc, mais c'est une réaction préparative plutôt qu'une méthode d'analyse. L'acétolyse est parfois préconisée comme étape additionnelle dans les opérations analytiques.

9.3.2 Hydrolyse enzymatique

Nous avons déjà parlé, au paragraphe 3.5.2 des enzymes glycosidases. Les *exoglycosidases* détachent un élément monosaccharidique situé à une extrémité non réductrice (il y en a souvent plusieurs car les chaînes sont ramifiées). Elles sont nommées en fonction de l'unité qu'elles détachent, neuraminidase (d'un autre nom de l'acide sialique, acide N-acétylneuraminique), fucosidase, galactosidase, mannosidases et aminohexosidases, et sont normalement spécifiques pour les configurations α ou β . En principe, elles permettent donc une dégradation résidu par résidu à partir de l'extrémité non réductrice et peuvent être employées en conjonction avec les méthodes par méthylation décrites ci-dessous.

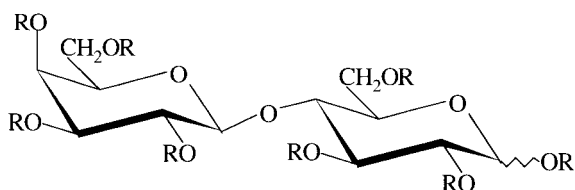
Nous n'avons pas décrit au chapitre 3 les *endoglycosidases*. Elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison glycosidique au milieu d'une chaîne et sont spécifiques de la configuration des deux sucres qu'elles séparent^[5]. La endo-2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucosidase coupe en son milieu la séquence dite « chitobiose » β -D-GlcNAcp-(1→4)- β -D-GlcNAcp- (présente à l'extrémité réductrice de certaines glycoprotéines. Un autre enzyme, une endo- β -D-galactosidase coupe spécifiquement la liaison entre galactose et N-acétylglucosamine dans la séquence fort commune $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-Glc NAc p (1→.

9.3.3 Analyse par méthylation

L'idée est d'éthérifier tous les hydroxyles libres. Comme les fonctions éthers résistent aux conditions de l'hydrolyse acide, on ne retrouve dans les morceaux, comme fonction hydroxylée libre, que celles qui étaient primitivement engagées dans la liaison glycosidique et celle de l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. Sur un exemple simple, le lactose **9.5**, perméthylé en **9.6**, on voit que l'hydrolyse acide de **9.6** donnera un galactose tétraméthylé **9.7** et un glucose triméthylé **9.8**, ce qui fixe l'agencement des deux résidus dans le disaccharide. Cette idée banale se heurte à quelques difficultés dans la mise en œuvre : il faut un solvant à propriétés contradictoires, puisque le système est très hydrophile au départ et très hydrophobe à l'arrivée. Dans un oligosaccharide assez important, il faut créer une grande quantité de fonctions alcoolate à charge négative et proches les unes des autres. Le solvant actuellement préféré est le diméthylsulfoxyde, CH_3SOCH_3 , et, comme base, on utilise l'anion correspondant, obtenu en ajoutant au diméthylsulfoxyde de l'hydruide de sodium ou du *ter*-butylate de potassium.

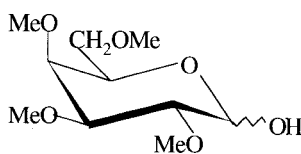
Pour pouvoir établir un diagnostic sûr, il est essentiel que la conversion des hydroxyles en alcoolates soit complète. On vérifie qu'on a bien un excès de $\text{CH}_3\text{SOCH}_2^-$ en utilisant la couleur rouge que donne cet anion avec le triphénylméthane. Cette méthode méthyle aussi les azotes amidiques des hexosamines *N*-acétylées.

Les méthodes que nous avons esquissées dans ces trois derniers paragraphes donnent finalement un mélange de monosaccharides ou de dérivés de monosaccharides à analyser. On pratique cette analyse par les méthodes chromatographiques décrites aux chapitre 1 et 3, avec éventuellement une transformation appropriée pour rendre les molécules volatiles. Le couplage chromatographie de vapeur-spectrométrie de masse est particulièrement utile. On a miniaturisé les opérations chimiques pour pouvoir traiter de très petites quantités d'échantillon.

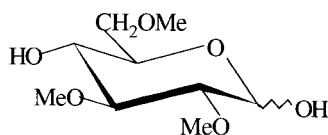


9.5 R= H

9.6 R= Me



9.7



9.8

Ceci était nécessaire, car on a rarement les oligosaccharides vraiment importants en quantité notable. Ils proviennent souvent de sources humaines. Les méthodes spectroscopiques, que nous abordons maintenant, permettent de reculer un peu plus loin les limites d'investigation.

9.4 DÉTERMINATION DES SÉQUENCES PAR LES MÉTHODES SPECTROSCOPIQUES

9.4.1 Spectrométrie de masse f.a.b

Dans cette spectroscopie^[6], dont le nom est l'abrégié de « *fast atom bombardment* », un jet d'atomes ou d'ions accélérés est projeté sur une cible constituée par une solution de l'échantillon dans un liquide visqueux. En frappant la surface de la cible, les atomes transmettent leur énergie cinétique aux molécules de l'échantillon. Beaucoup sont projetées hors de la cible dans le vide de la source d'ions et ionisées en proportion notable. De cette façon, les ions en phase gazeuse sont produits sans volatilisation préalable de l'échantillon. Il se forme des ions positifs $[M + H]^+$, $[M + \text{cation}]^+$ et négatifs $[M - H]^-$, surtout, et aussi, $[M + \text{anion}]^-$, selon la nature de l'échantillon et de la matrice visqueuse. On emploie de préférence le glycérol avec les molécules polaires, tels que les oligosaccharides et les glycopeptides natifs, mais pour les composés hydrophobes comme les glycosphingolipides, qui ont tendance à s'agglomérer dans les solvants polaires, on préfère le 1-thioglycérol $\text{CH}_2\text{SH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$. Il est utile d'acidifier le mélange avec des traces d'HCl dilué. L'addition d'acétate de sodium entraîne la formation d'ions $[M + \text{Na}]^+$. L'addition de thiocyanate d'ammonium à certains oligosaccharides perméthylés entraîne la formation d'ions $[M + \text{NH}_3]^+$ et $[M + \text{SCN}]^-$. Seules les molécules présentes à la surface de la matrice sont ionisées par le jet atomique et il faut éviter la présence d'impuretés plus tensio-actives qui les en chasseraient.

On observe des pics intenses d'ions pseudo-monomoléculaires et des pics de fragments. On emploie les sucres non dérivés pour déterminer M, mais il est souvent utile de préparer d'abord un dérivé par perméthylation (voir le paragraphe 9.3.3) ou peracétylation (traitement par un mélange d'acide acétique et d'anhydride trifluoracétique, 2 : 1, v/v, 9 mn à température ambiante). Les quantités d'échantillon nécessaires à l'investigation sont 1-9 μg de sucre libre, ou 0,1-5 μg de dérivé. Trois types de sucre donnent des pics au-dessus de M 4000 : les polysaccharides perméthylés, les glycosphingolipides perméthylés et les formes naturelles acylées des polysaccharides mycobactériens.

Nous donnerons deux modes de clivage, désignés comme dans la référence^[6] (Fig. 9.5). Dans le mode A, le principal, la charge est retenue sur le fragment du côté de l'extrémité non réductrice. Dans le mode B, la charge est retenue du côté de l'extrémité réductrice. Avec les oligosaccharides dérivés, MNPQR, où M est le résidu monosaccharidique du côté non réducteur, on observe principalement la voie A selon l'équation (9.2).

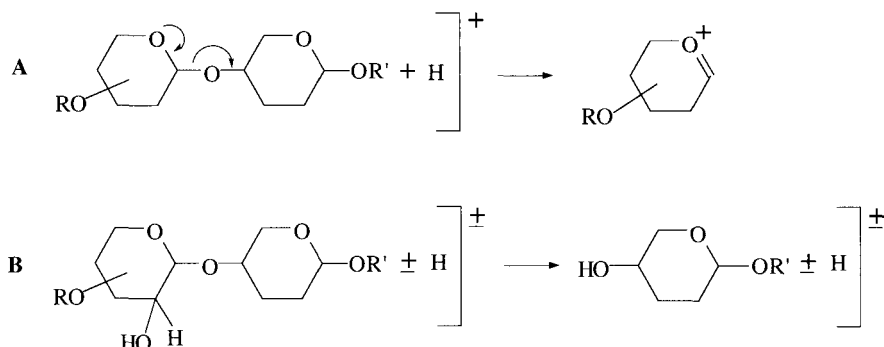
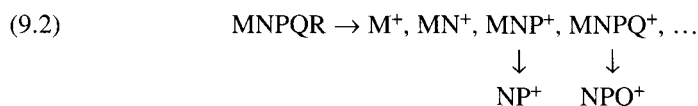


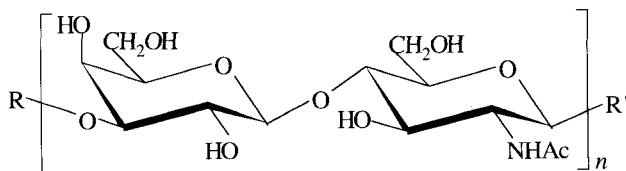
Figure 9.5 Deux modes de clivage des chaînes d'oligosaccharides en spectroscopie f.a.b.



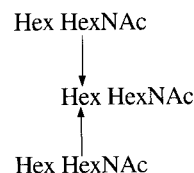
Les flèches verticales aboutissent à des fragments dus à deux ruptures. La masse des fragments renseigne sur leur composition, car l'addition à la structure fondamentale méthylée Hex-HexNAc⁺ de résidus fucose, N-acétylneuraminique ou *N*-glycolylneuraminique méthylés se traduit par des incréments de masse caractéristiques différents. On ne distingue pas les isomères et on donne une composition en hexoses, pentoses, désoxyhexoses, hexosamine, etc. Le clivage a lieu de façon dominante et, parfois même exclusive, sur les gros oligosaccharides perméthylés, à chaque résidu hexosamine, selon l'équation (9.3).



La spectroscopie f.a.b. n'est pas restreinte aux glycolipides (voir le paragraphe 13.1) mais leur est très bien adaptée. On a observé avec un glycosphingolipide naturel à 25 résidus mono-saccharidiques perméthylés un signal $[\text{M} + \text{Na}]^+$ à 6184. La figure 9.6 donne les fragmentations principales d'un ganglioside perméthylé isolé de granulocytes^[7]. En plus des fragmentations du type déjà décrit, on observera le clivage, qui est de règle, entre l'oligosaccharide et la chaîne lipidique céramide. L'ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ perd le groupe acyle en donnant un ion de masse caractéristique du type de ganglioside — dans le cas de la figure 9.6, $[\text{M} + \text{H}]^+ - 238$.



9.9



9.10

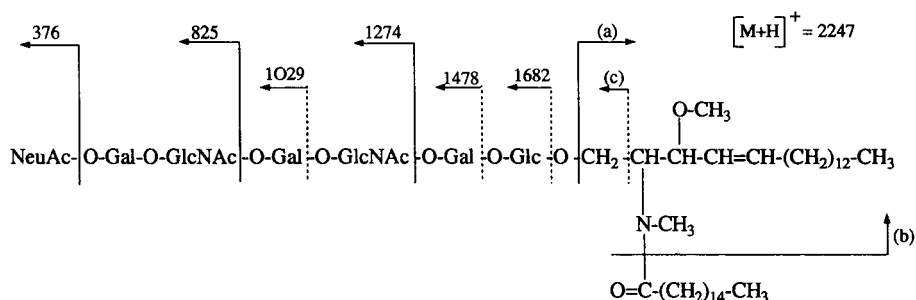
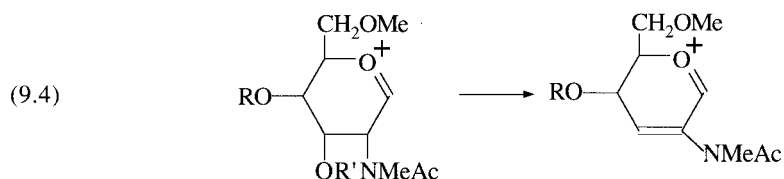


Figure 9.6 Représentation schématique de la fragmentation d'un ganglioside perméthylé de granulocytes. Extrait de M. N. Fukuda, A. Dell, J. E. Oates, P. Wu, J. C. Klock et M. Fukuda ; *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 967-982 (publié avec l'aimable autorisation d'Academic Press).

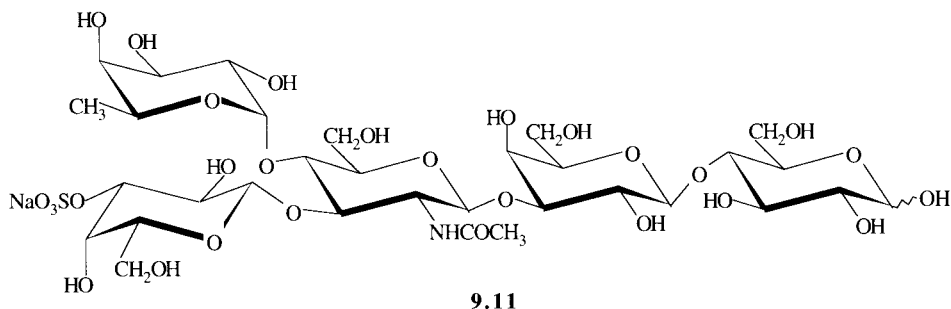
La tendance au clivage au niveau des résidus HexNAc est particulièrement intéressante dans l'examen des glycolipides. Il y a dans ces composés une chaîne principale formée de résidus β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcNAc, correspondant au disaccharide *N*-acétyllactosamine. Ces résidus disaccharidiques sont reliés par des liaisons (1 $\rightarrow$ 3) de façon schématisée en 9.9. L'hexasaccharide ($n = 3$), qui est non ramifié, donne des fragments à 3,2 et 1 unités HexHexNAc. En revanche, l'hexasaccharide ramifié 9.10 perméthylé ne donne pas de fragment tétrasaccharidique (il faut se rappeler que la charge reste du côté non réducteur).

La spectroscopie f.a.b. ne permet en général pas de déterminer la position des liaisons. Cependant on peut parfois reconnaître la présence d'un fucose en 3 du résidu β -D-GlcNAc. Lorsque l'ion de rupture principale a une masse inférieure à 900, on peut observer une fragmentation ultérieure, selon l'équation (9.4). Si OH(3) n'était pas substitué dans l'oligosaccharide, la perte de masse correspondrait à CH_3OH , 32. S'il y avait un fucose, la perte de masse serait 206.



9.4.2 Technique d'injection dite « électrovaporisation »

Certains modèles récents de spectromètres de masse permettent d'employer une technique d'injection considérablement plus simple. Une solution de l'échantillon est injectée directement dans l'appareil au moyen d'une seringue. On observe des pics moléculaires parfaitement détachés. Nous donnerons ici l'exemple du spectre du pentasaccharide sulfaté, sel de sodium, 9.11. Nous aurons l'occasion de



revenir au chapitre 17 sur ce composé synthétique^[8], qui est le meilleur ligand connu à ce jour de la lectine E-sélectine humaine. On observe avec la technique d'électrovaporisation des pics 932,2 (M - Na⁺), 978,3 (M + Na⁺) et 500,7 (M + 2 Na⁺).

9.4.3 Résonance magnétique nucléaire du proton

Le chimiste qui désire connaître la structure d'un oligosaccharide naturel conjugué doit en général travailler sur un mélange d'espèces très voisines. Il y a en effet le problème de l'hétérogénéité naturelle de ces structures, même sur un support protéique homogène, et de l'hétérogénéité artificielle provoquée par les réactifs de clivage — car il n'est pas concevable d'étudier le glycoconjugué dans son ensemble. Il est donc nécessaire de procéder d'abord à un fractionnement, particulièrement difficile entre structures très voisines. L'analyse du spectre de RMN du proton, telle qu'elle sera décrite dans ce paragraphe^[9], donne une indication sur l'homogénéité de l'échantillon, puisqu'un mélange donne une superposition des signaux, dont on peut connaître l'appartenance par la considération des intensités.

En raison de la grande complexité du problème de structure, il est nécessaire de connaître les valeurs de δ avec trois décimales. Ceci impose un champ magnétique très élevé (jusqu'à 14 Tesla) pour une fréquence de travail de 500 ou 600 MHz. Le traitement informatique des données permet d'augmenter la résolution et de descendre jusqu'à des concentrations 0,05 mM de l'échantillon. Même à cette fréquence les signaux des protons squeletaux non anomériques des divers sucres se superposent en une large bande non résolue entre 3,4 et 4,0 p.p.m. L'analyse repose sur un groupe de signaux, *les indicateurs*, situés en dehors de cette région. Ils correspondent aux protons énumérés ci-dessous.

a) Les protons anomériques

On rappelle que leur couplage 3J est significatif (voir le chapitre 2). Si H-2 est axial (Gal, GlcNAc, Fuc), on observe 3J 2-4 Hz et 7-9 Hz pour les α -pyranoses et β -pyranoses respectivement. Si H-2 est équatorial (Man), la différence est plus faible, 3J 1,6 et 0,8 Hz pour les anomères α et β respectivement. Cependant c'est la valeur de δ qui est la plus intéressante.

- b) Les protons H-2 et H-3 du mannose
- c) Les protons H-3 des acides sialiques
- d) Le proton H-5 et le méthyle du fucose
- e) Les protons H-3 et H-4 du galactose
- f) Le méthyle des groupements N-acétyle des sucres aminés et de l'acide sialique

Dans les cas les plus favorables, la valeur de δ dépend du type de résidu, de sa configuration anomérique, du site de glycosidation, de la séquence des sucres composants et de la position du résidu dans la séquence. On a récemment^[10] ajouté à cette liste les protons NH des groupements -NHCOCH_3 . Naturellement, ils ne sont pas visibles dans le solvant D_2O ni dans l'eau ordinaire aux $\text{pH} > 7$. On les observe facilement dans H_2O , à 27°C , $\text{pH} 5,2$. Lorsqu'un signal NH a été identifié, on peut repérer les signaux de certains protons voisins du même résidu monosaccharidique par effet Overhauser : le méthyle de CH_3CONH et le proton anomérique sur un résidu 2-acétamido-2-déoxy pyranose, les protons H-3 sur un sialoside.

Pour utiliser ces données spectroscopiques, on se sert d'un certain nombre de règles empiriques, établies sur des oligosaccharides simples de structure parfaitement bien connue par ailleurs. Ainsi la glycosidation d'un résidu dans un oligosaccharide entraîne de petits déplacements des signaux indicateurs de ce résidu, parfois également perceptibles dans les résidus voisins, de l'ordre de 0,02 - 0,25 p.p.m. L'emploi de ces règles à des déterminations de structures inconnues suppose qu'il y a additivité et qu'il n'y a pas de changement important de conformation, qui perturberait fortement le diamagnétisme local. Elles sont donc les plus sûres dans les séries formées de blocs analogues. Pour que le lecteur puisse apprécier ceci, nous allons donner un extrait d'une analyse de ce type des chaînes oligosaccharides de la thyro-globuline porcine^[11]. C'est la glycoprotéine la plus importante de la glande thyroïde. La chaîne glucidique, liée à l'acide aspartique, est séparée par hydrolyse catalysée par l'enzyme peptide- N^4 - (*N*-acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase F, d'origine bactérienne (*Flavobacterium meningosepticum*), et le mélange d'oligosaccharides est fractionné sur colonne. Parmi les produits isolés, nous retiendrons la collection schématisée sur la figure 9.7. Le terme le plus simple est le nonasaccharide **9.12**, où manquent les résidus encadrés et le sulfate. On repère les signaux indicateurs de ce nonasaccharide, et l'on observe que le signal de H(2) du résidu Man-4'est noyé dans la masse. Il y a aussi dans la collection un décasaccharide avec un résidu GlcNAc supplémentaire. Dans ce composé, le signal de H-2 de Man-4'sort de la masse et apparaît à δ 4,109, ce qui indique que le nouveau résidu GlcNAc est en 2 du mannose Man-4'. Les signaux indicateurs confirment sa position terminale, celle du cadre 5'. L'addition du résidu D-Gal donne un undécasaccharide. On en connaissait déjà un proche analogue^[9]. La position de ce résidu est confirmée comme celle du cadre 6' par un déplacement de +28 mpm du signal de H-1 de GlcNAc - 5'. Le terme suivant de la collection est un dodécasaccharide. Il contient en plus un résidu Gal,

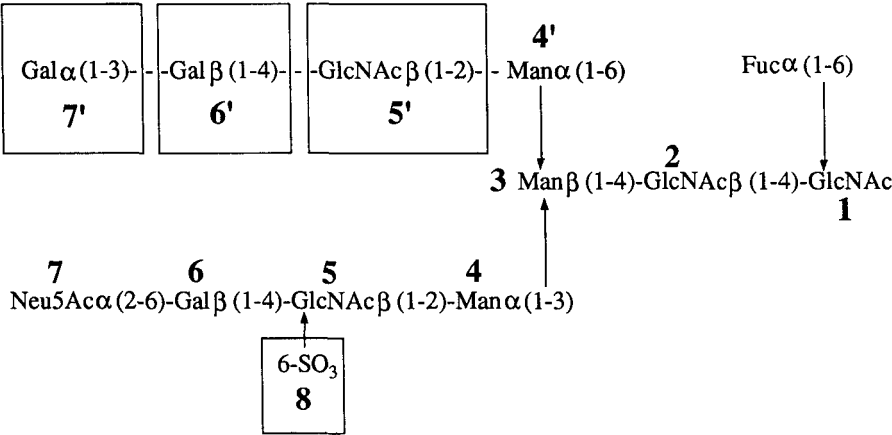
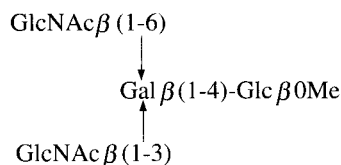
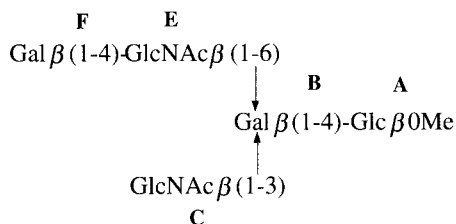


Figure 9.7 Représentation schématique des oligosaccharides obtenus à partir de la thyroglobuline du porc. La partie sans unités encadrées correspond à **9.12**. Les autres oligosaccharides séparés sont **9.12** + 5', **9.12** + 5' et 6', **9.12** + 5' + 6' + 7', et le dodécasaccharide sulfaté **9.13** (**9.12** + 5' + 6' + 7' + 8).

dont l'anomérie α est prouvée par le signal de son proton anomère et la position, celle du cadre 7, par l'effet de sa présence sur le signal de H-4 de Gal-6', qui sort de la masse pour apparaître à δ = 4,185 ppm. Nous avons donné les signaux caractéristiques de **9.13** dans le tableau 9.2, pour permettre au lecteur d'apprécier

Protons	Unités	δ	Protons	Unités	δ
H-1	1 α	5,180	H-2	4'	4,111
	1 β	4,692	H-3a	Neu 5Ac	1,722
	2 (α)	4,664	H-3e	Neu 5Ac	2,666
	2 (β)	4,669	H-4	6'	4,185
	3	4,772	H-5	Fuc (α)	4,098
	4	5,135		Fuc (β)	4,134
	4'	4,929	Me	Fuc (α)	1,209
	5	4,605		Fuc (β)	1,220
	5'	4,583	NAc	1	2,038
	6	4,445		2	2,097
	6'	4,544		5	2,069
	α-Gal	5,146		5'	2,048
	Fuc (α)	4,890		Neu 5Ac	2,029
	Fuc (β)	4,897			
H-2	3	4,257			
	4	4,195			

Tableau 9.2 Signaux indicateurs du dodécasaccharide **9.13**.

**9.14****9.15**

concrètement les résultats de ce genre de travail. On trouve aussi dans le mélange une collection d'oligosaccharides sulfatés. La sulfation déplace vers les champs faibles les protons géminés. Ici, ce sont les signaux de H-6 et H-6' de GlcNAc-5 qui sortent de la masse ($\delta = 4,306$ et $4,440$), ce qui indique la position du cadre 8 pour le groupement sulfate.

Dans certains cas on a pu mesurer δ pour *tous* les protons d'un oligosaccharide. Ainsi on a pu montrer que la galactosylation enzymatique (voir le paragraphe 10.4.1) du tétrasaccharide **9.14** procède sélectivement sur la branche liée en 6 du résidu GlcNAc, car c'est seulement le signal de H-1 de ce résidu qui est perturbé (+23 mp.p.m.). Par RMN à deux dimensions, il a été possible de donner les signaux de *tous* les protons du pentasaccharide **9.15** ainsi obtenu après peracétylation (Tableau 9.3)^[12].

Proton	A	B	C	E	F
H-1	4,40	4,35	4,96	4,67	4,51
H-2	4,87	5,05	3,39	3,71	5,14
H-3	5,11	3,80	5,43	5,32	5,01
H-4	3,78	5,41	5,08	3,75	5,32
H-5	3,60	3,81	3,67	3,67	3,89
H-6	4,17	3,54	4,14	4,14	4,05
H-6'	4,48	3,80	4,55	4,37	4,90
H-N			5,62	6,42	

Tableau 9.3 Valeurs de δ en p.p.m. pour les signaux des protons des unités A, B, C, E, F du produit de peracétylation du pentasaccharide **9.15**.

9.5 EFFICACITÉ POTENTIELLE DES OLIGOSACCHARIDES POUR LE STOCKAGE ET LE TRANSPORT DE L'INFORMATION

Deux désoxyribonucléotides, disons *dA* et *dC*, ne peuvent donner que deux combinaisons distinctes, *dAdC* et *dCdA*. C'est la même même chose avec deux amino-acides, il y a deux dipeptides possibles, par exemple *CysAl* et *AlCys*. Dans les deux cas, deux molécules identiques ne peuvent donner qu'un seul produit de condensation. En revanche, le lecteur vérifiera que l'association de deux molécules de glucose peut donner 11 disaccharides distincts si on se restreint aux tautomères pyranose. Le nombre s'accroît dans des proportions fantastiques, si l'on considère les oligosaccharides dérivés de monosaccharides différents. Quatre nucléotides différents ne peuvent donner que 24 tétranucléotides distincts, alors que 4 monosaccharides différents peuvent donner 35 560 tétrasaccharides distincts^[13]. La nature dispose d'un alphabet où 4 lettres permettent d'écrire 35 560 mots différents ! Dans la mesure où ces molécules peuvent être reconnues par des protéines spécialisées, on voit qu'un très petit nombre d'éléments de base peut suffire pour stocker et transmettre les informations les plus variées, sous la forme la plus compacte qui soit concevable dans les cellules vivantes. Ceci sera longuement développé dans la suite de cet ouvrage.

RÉFÉRENCES

- [1] I. Tvarovška et T. Bleha, *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.*, 47 (1989) 45-123.
- [2] I. Tvarovška, M. Hricovini et E. Petraková, *Carbohydr. Res.*, 189 (1989) 359-362.
- [3] P. Dais et A. S. Perlin, *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.*, 45 (1987) 125-168.
- [4] C. J. Biermann, *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46 (1988) 251-271.
- [5] H. Rauvala, J. Finne, T. Krusius, J. Kärkkäinen et J. Järnefelt, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 389-416.
- [6] A. Dell, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 45 (1987) 19-72.
- [7] M. N. Fukuda, A. Dell, J. E. Oates, P. Wu, J.C. Klock et M. Fukuda, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 967-982.
- [8] A. Lubineau, J. Le Gallic et R. Lemoine, *à paraître*.
- [9] J. F. G. Vliegthart, L. Dorland et H. van Albeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.
- [10] K. Hård, B. A. Spronk, C. H. Hooke, J. P. Kamerling et J. F. G. Vliegthart, *F.E.B.S.*, 287 (1991) 98-112.
- [11] P. de Waard, A. Koorevaar, J. P. Karmeling et J. F. G. Vliegthart, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 4237-4243.
- [12] C. Augé, C. Mathieu et C. Mérienne, *Carbohydr. Res.*, 151 (1980) 147-156.
- [13] N. Sharon et H. Lis, *Scientific American*, (1993) 74-81.

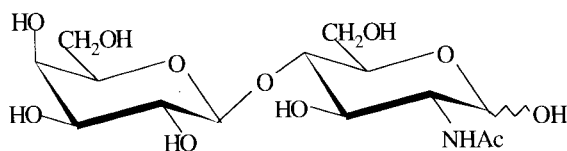
Transformations chimiques et synthèse des oligosaccharides

10.1 RÉACTIONS DES OLIGOSACCHARIDES

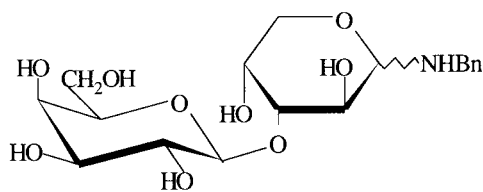
Dans un oligosaccharide réducteur, il y a deux fonctions hydroxylées différentes, alcool et hémiacétal. Les fonctions alcools se répartissent en deux catégories, primaires et secondaires, moyennement bien différenciée. Il y a des différences plus subtiles entre les fonctions alcool secondaire, selon qu'elles sont axiales ou équatoriales, associées en diol vicinal, etc. Il n'y a rien de fondamentalement nouveau par rapport aux monosaccharides et la chimie connue des oligosaccharides repose sur des réactions sélectives correspondantes.

Comme exemple, on peut donner la préparation d'un disaccharide très important, la *N*-acétyllactosamine, **10.1** à partir du lactose, produit de faible valeur. L'oxime de la fonction aldéhyde potentielle, soit $R - \text{CHOH} - \text{CH} = \text{N} - \text{OH}$, est acétylée et déshydratée simultanément en nitrile peracétylé $R' - \text{CHOAc} - \text{CN}$. La méthanolyse alcaline désacétyle et provoque l'élimination de HCN , donnant $R - \text{CHO}$, le disaccharide *O*- β -D-galactopyranosyl - (1 $\rightarrow$ 3) - D-arabinose. Celui-ci est commodément isolé sous la forme dérivée *N*-benzyl glycosylamine **10.2**. L'addition de HCN donne le nitrile **10.3**, qui est converti en *N*-acétyllactosamine par hydrogénation catalytique sur palladium et *N*-acétylation par l'anhydride acétique dans le méthanol^[1]. Une adaptation plus récente^[2] évite l'emploi de HCN , en procédant par addition progressive d'acide acétique à du cyanure dissous dans le milieu réactionnel. On recueille par filtration le nitrile **10.3**, obtenu cristallin par chance, ce qui ouvre la voie à la fabrication à grande échelle.

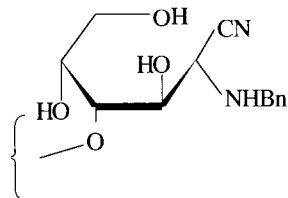
On peut oxyder sélectivement la fonction aldéhyde du lactose en carboxyle, ce qui donne l'acide lactobionique. On peut aussi la réduire en alcool. Nous verrons plus loin qu'on est amené à utiliser des conditions alcalines pour détacher certains



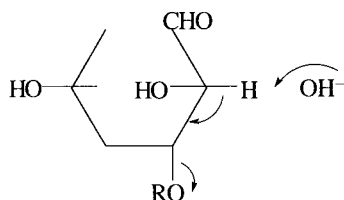
10.1



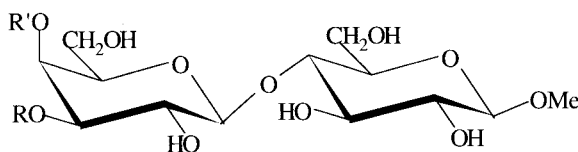
10.2



10.3



10.4



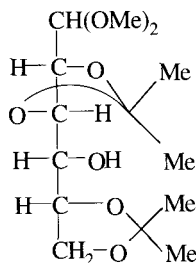
10.5 R = R' = H

10.6 R, R' = CMe₂10.7 R, R' = SnBu₂

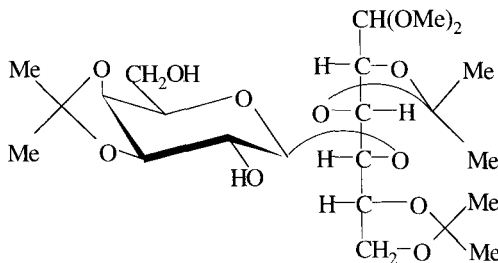
10.8 R = Allyl, R' = H

oligosaccharides de leur support protéique. Ces conditions dégradent l'oligosaccharide, particulièrement s'il y a une substitution en 3, car il se produit l'élimination bien connue des β -alkoxyaldéhydes sur la fraction de tautomère carbonyle présente, schématisée par la formule 10.4. La technique consiste alors à pratiquer le clivage avec un mélange d'hydroxyde et de borohydrure de sodium. L'hémiacétal est réduit en alcool ; il n'y a plus d'élimination.

On protège les alcools primaires avec les réactifs traditionnels : triphénylchlorométhane, chlorure de *ter*-butyldiméthylsilyle, chlorure de pivaloyle. Un système *cis*-diol, axial-équatorial est bloqué, sélectivement s'il est unique, par acétalation avec l'acétone. On bloque ainsi sélectivement les hydroxyles en 3 et 4 de l'unité galactose du méthyl lactoside 10.5 en préparant le dérivé isopropylidène 10.6. On notera à ce propos une réaction où chaque unité de lactose se comporte comme si elle était isolée : le traitement du glucose par l'acétone et le 2,2-diméthoxypropane, en catalyse acide, donne, entre autres, 10.9^[3]. Dans les mêmes conditions, le



10.9



10.10

lactose donne le produit **10.10** où 6 hydroxyles sur 8 sont bloqués^[4]. Avec $(\text{Bu}_2\text{SnO})_n$, le lactoside **10.5** donne un stannylène, vraisemblablement **10.7**, dont le traitement par le bromure d'allyle conduit à l'éther monoallylique **10.8**. C'est le seul produit de substitution isolé, avec un rendement de 70 %, alors qu'il n'y avait pas moins de sept hydroxyles libres dans le lactoside de départ^[5]. Les groupements diols vicinaux des oligosaccharides sont coupés par le periodate, ce qui permet de détruire sélectivement les unités monosaccharidiques qui en possèdent. On note ensuite leur disparition de l'hydrolysats total.

On verra ci-dessous (voir le paragraphe 10.3.4) l'utilisation de l'inversion de configuration sur C(2) d'une unité monosaccharidique pour accéder à la configuration β -D-*manno*. Une des transformations les plus importantes des oligosaccharides est l'activation de l'extrémité réductrice pour réaliser des synthèses convergentes d'oligosaccharides supérieurs, dont nous donnerons aussi des exemples dans les paragraphes suivants.

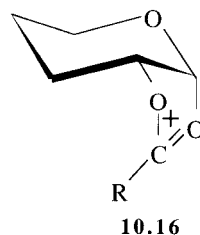
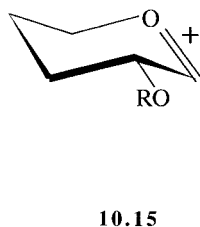
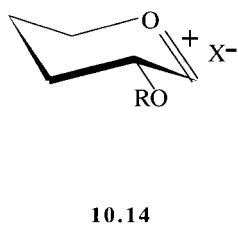
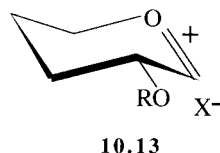
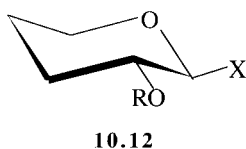
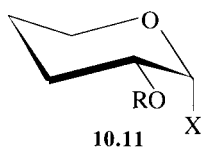
Comme nous l'avons dit, ces réactions sont des extensions prévisibles des réactions des monosaccharides. Il pourrait y avoir un domaine spécifique de la chimie des oligosaccharides : comment la réactivité de chaque hydroxyle est-elle modifiée par le reste d'un enchaînement complexe, par sa configuration et sa conformation ? Y a-t-il des fonctions qui ont perdu toute réactivité ou bien, au contraire, des sites préférentiels inattendus, comme les sites actifs des protéines. Ce domaine n'a pas été exploré avec les oligosaccharides vraiment compliqués

10.2 COUPLAGE OSIDIQUE NON ENZYMATIQUE : PRINCIPES GÉNÉRAUX

Le couplage osidique est l'opération fondamentale dans la synthèse des oligosaccharides. Il s'agit de bâtir un pont oxygène avec le carbone hémiacétalique d'un sucre et la fonction alcool d'un autre sucre^{[6] [7] [8]}. Considérant la très grande stabilité de la liaison C – O dans les alcools, comparée à la labilité de la liaison C – O dans un hémiacétal, dans l'immense majorité des cas, la réaction est globalement une substitution nucléophile de l'oxygène alcoolique sur le carbone hémiacétalique.

L'hydroxyle n'étant pas un bon groupement partant, il faut le remplacer par d'autres groupements pour activer le partenaire électrophile. Il faut aussi protéger les fonctions alcools pour éviter que dans les conditions du couplage, les molécules ne réagissent les unes sur les autres en donnant des produits de polycondensation. Ces molécules protégées activées que nous appellerons « réactifs glycosylants » ne sont pas capables de réagir directement sur les hydroxyles alcooliques, il faut ajouter dans le milieu des acides de Lewis, ou des sels ayant un caractère d'acides de Lewis plus ou moins marqué, en proportions variables selon les techniques, depuis catalytique jusqu'à fort excès molaire. Ce sont les « promoteurs ».

Dans ces conditions, on peut prévoir que le réactif glycosylant existera sous six formes chimiques distinctes, **10.11** à **10.16**. D'ailleurs, même si on introduit au départ un réactif homogène **10.11** ou **10.12**, il se formera souvent le mélange anomérique dans le milieu réactionnel. L'individu chimique **10.13** est une paire ionique provenant de l'ionisation partielle de l'anomère α . La formation de cette paire ionique est facilitée par la coordination de X^- à un acide présent dans le milieu. En présence de promoteurs de type salin, l'anion du sel peut éventuellement remplacer, dans cette paire ionique, le groupement partant X^- du réactif glycosylant de départ. La paire ionique **10.13** peut s'anomériser en **10.14**. L'individu chimique **10.15** est l'ion oxocarbenium libre. La formation d'un ion carbénium sur C(1) est favorisée par la participation de l'oxygène cyclique. Cependant, s'il y a un groupement participant acyloxy sur C(2), l'intermédiaire a la structure **10.16**. Les deux problèmes de la glycosidation, qui d'ailleurs ne sont pas complètement indépendants, c'est que le rendement du couplage soit acceptable et que ce couplage donne la liaison glycosidique avec l'anométrie désirée. Il faut d'emblée mettre à part les réactions avec participation, qui passent par l'intermédiaire **10.16**. Elles sont souvent rapides et donnent exclusivement l'anomère 1,2-trans, comme il est prévisible, avec un excellent rendement. Lorsqu'il n'y a pas participation, on peut s'attendre à ce que chacun des intermédiaires **10.11** à **10.14** réagis-

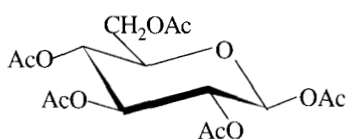
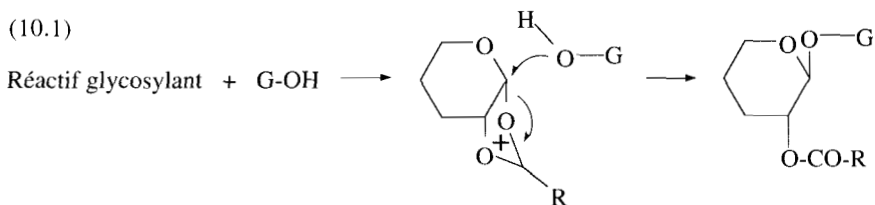


sent par le mécanisme SN2 avec inversion de configuration. On aura donc la liaison équatoriale avec **10.11** et **10.13**, la liaison axiale avec les deux autres. Malheureusement ces intermédiaires sont en général tous présents simultanément, quel que soit le réactif glycosylant ajouté au départ. On attend peu de sélectivité d'une réaction de l'ion oxocarbenium **10.15**. Donc le partenaire nucléophile dans le milieu a le choix entre un certain nombre de trajets réactionnels dont les énergies d'activation peuvent n'être pas tellement différentes. Aussi comprendra-t-on que le couplage osidique, malgré les progrès considérables de la dernière décennie reste une opération dont l'issue ne peut être prédite avec une certitude totale.

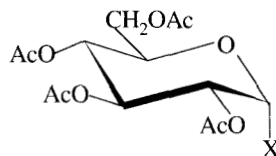
10.3 PRATIQUE DU COUPLAGE OSIDIQUE

10.3.1 Réactions avec participation

Ce sont les moins incertaines. Elles conduisent selon la réaction (10.1) à l'anomère *trans* 1,2. Les configurations *gluco* et *galacto* donnent les glycosides di-équatoriaux -1,2 et la configuration *manno* donne les glycosides di-axiaux-1,2. Les plus simples des réactifs glycosylants sont les anomères équatoriaux des peracétates de pyranoses tel le dérivé β -D-*gluco* **10.17**. Celui-ci, en présence de trifluorométhanesulfonate (triflate) de triméthylsilyle, $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{SiMe}_3$ comme promoteur, conduit aux β -D-*glucopyranosides*. L'intérêt de la réaction est limité par la nécessité de préparer cet anomère instable et le prix élevé du promoteur. Le traitement des pyranoses peracétylés par HCl ou HBr donne l'anomère stable, avec l'halogène axial, de l'halogénose, **10.18** ou **10.19**. Le « promoteur universel » pour les couplages de ces halogénoses semble être le triflate d'argent^[9]. Son domaine d'efficacité est très étendu et parfois le couplage est terminé en quelques minutes, même à -70°C . On opère dans le dichlorométhane, avec la tétraméthylu-

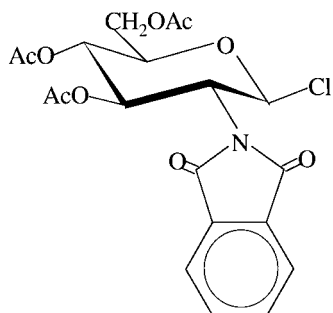
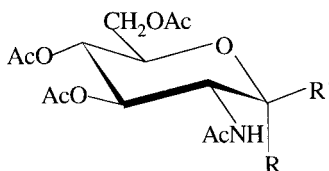


10.17



10.18 X= Cl

10.19 X= Br

**10.20****10.21** R= H, R'= OAc**10.22** R= OAc, R'= H**10.23** R= Cl, R'= H

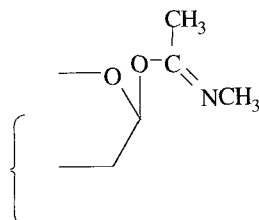
rée comme accepteur de protons. Pour préparer de grosses quantités au début d'une séquence réactionnelle, on utilise aussi les promoteurs classiques (HgBr_2 ou HgCl_2 dans les mélanges toluène-acétonitrile ou nitrométhane) ou le triflate stanneux dans le dichlorométhane^[10].

Pour faire les glycosides des sucres aminés, la préférence va au chlorure dérivé de la phtalimido-glucosamine **10.20**. Cet anomère β est beaucoup plus réactif que l'anomère α en glycosidation et on l'obtient commodément^[11] par traitement du mélange d'acétates anomères (analogues phtalimido de **10.21** et **10.22**) par le dichlorométhyl méthyl éther en présence d'éthérate de BF_3 . Le chlorure **10.20** s'utilise avec le triflate d'argent comme promoteur ou, dans les cas où il est moins indispensable d'avoir le rendement maximum, avec les sels de mercure. On hydrolyse le groupement phtalimido avec de l'hydrazine et on acétyle l'amine libérée pour obtenir la véritable structure naturelle. Il est parfois possible d'éviter ces étapes supplémentaires en partant directement d'un dérivé actif de l'amine naturelle qui est, comme on sait, *N*-acétylée. Le β -acétate **10.21**, dérivé de la *N*-acétylglycosamine, donne un bon rendement en présence de chlorure ferrique^[12]. Le chlorure **10.23**, d'accès plus facile, est utilisable en présence de triflate stanneux^[13]. La réaction est particulièrement efficace avec les alcools primaires, par exemple pour préparer la séquence β -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal, fréquente dans les oligosaccharides naturels.

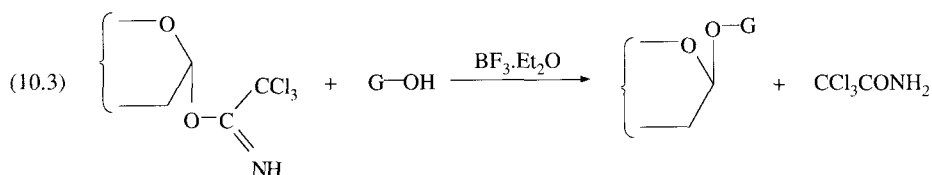
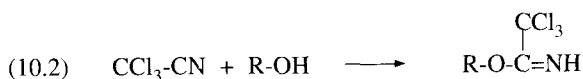
10.3.2 Réactions $\text{S}_{\text{N}}2$

En présence de sels d'argent, les halogénures de glycosyles attaquent les amides sur l'oxygène pour donner les imidates tels que **10.24**. Les imidates sans groupements participants réagissent sur les alcools avec inversion de configuration, conduisant aux composés *cis*-1,2^[14]. Les trichloracétimides^[7] sont facilement accessibles par addition des alcools sur le trichloracétonitrile, selon l'équation (10.2) en présence de bases fortes. Avec les pyranoses hémiacétal l'imidate équatorial se forme le premier, sous contrôle cinétique, et s'anomérise ensuite en imidate axial. Les deux types d'imidates réagissent en présence de trifluorure de

bore avec les alcools, par exemple selon l'équation (10.3). Il y a inversion de configuration avec ou sans participation.



10.24

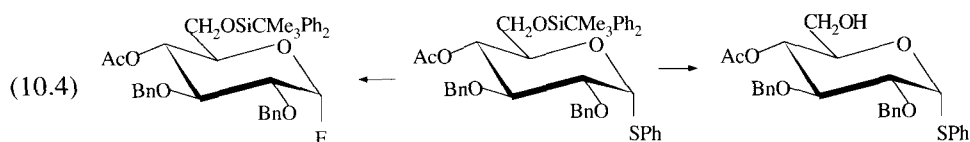


10.3.3 Réactions faisant intervenir des intermédiaires cationiques

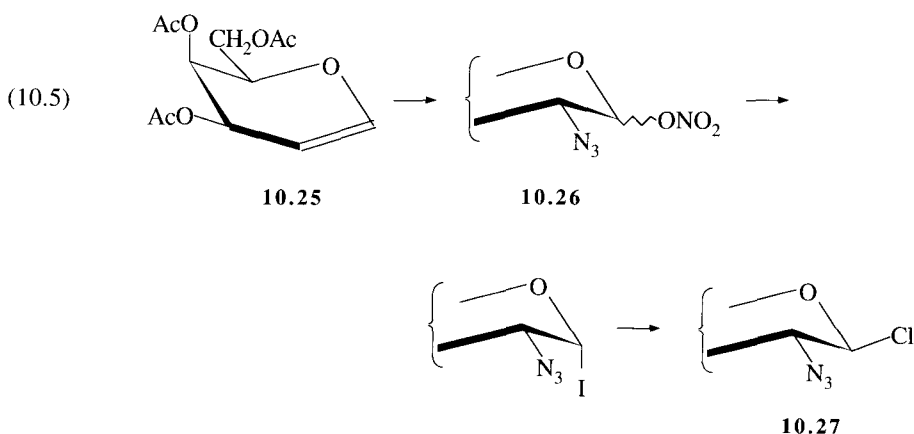
La réaction « assistée par un halogénure » s'applique à un halogénure sans groupement participant en 2. L'intermédiaire **10.16** est donc exclu. On travaille dans un solvant non polaire pour minimiser l'apparition de l'intermédiaire ionique **10.15**. Restent les formes chimiques **10.11** à **10.14**, qui sont en équilibre, et on accélère l'établissement de cet équilibre par addition d'un sel minéral qui fournit un ion commun X^- . L'intermédiaire le plus réactif en glycosidation est la paire ionique équatoriale **10.14** qui conduit dans le cas de figure au glycoside *cis*-1,2, anomère axial. Si la vitesse d'apparition de **10.14** est nettement supérieure à sa vitesse de couplage, toute la glycosidation sera déviée par ce canal, quel que soit l'anomère ajouté au départ. Parfois, le partenaire hydroxylé est trop peu réactif pour que la condensation procède de façon acceptable (il n'y a pas de promoteur dans le milieu !). Dans ces cas-là, c'est le triflate d'argent qui est le promoteur le plus efficace, la sélectivité étant d'autant plus grande que l'hydroxyle est moins réactif.

On a essentiellement développé ces méthodes pour introduire un résidu α -D-galactopyranosyle, ce qui correspond à une glycosidation *cis*-1,2. Pour réaliser cet objectif, on a publié récemment une méthode particulièrement brillante, mais nous la classerons à part (voir le paragraphe 10.3.5) pour ne pas préjuger de son mécanisme.

A côté des chlorures et bromures de pyranosyle, l'usage des fluorures tend à se répandre pour les glycosidations sans participation. Le substituant en 2 est protégé par un benzyle. Le fluorure *cis* 1,2, axial-équatorial, donne le glycoside *cis* 1,2, axial, équatorial, en solution dans l'éther en présence de perchlorate d'argent et de triflate stanneux. Les fluorures, comme d'ailleurs les bromures, peuvent être préparés à partir des thioglycosides. Le passage par le thioglycoside est un moyen de protéger temporairement la fonction hémiacétalique, car la liaison C(1)-S peut persister intacte à travers un certain nombre de transformations du reste de la molécule. Ceci est également vrai des méthyl glycosides, seulement les thioglycosides sont transformés en réactifs glycosylants d'une façon bien plus commode que les méthyl glycosides, avec moins de risques pour le reste de la molécule. L'équation (10.4) montre comment on peut convertir un même phényl thioglycoside en partenaire glycosylant ou glycosylable, en le traitant soit par $\text{Et}_3\text{N-SF}_3$, soit par Bu_4NF .

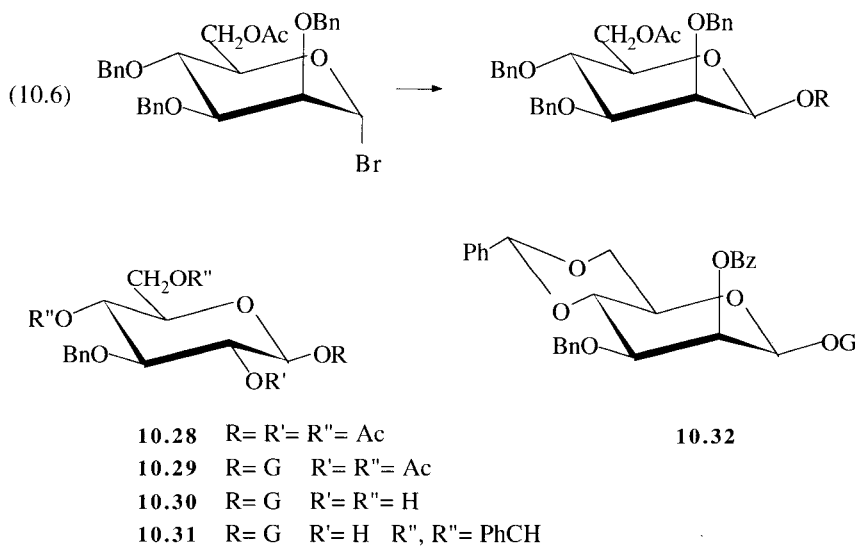


Dans les réactifs glycosylants non animés, la protection non participante de O(2) est assurée par un benzyle. Dans les réactifs glycosylants aminés, le groupement acétamido est remplacé par un groupement azido, qui est réduit en amine et *N*-acétylé après la glycosidation. La préparation habituelle des azides en 2 part des glycals. Par exemple, la réaction (10.5) donne la préparation d'un halogénose **10.27** utilisable pour introduire une unité 2-acétamido-2-déoxy- α -D-galactopyranosyl. Le galactal **10.25** est traité par un mélange de nitrate de cérium et d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ et d'azoture de sodium. Il y a addition sur la double liaison donnant **10.26** et le nitrate intermédiaire est traité successivement par l'iodure de lithium et le chlorure d'ammonium^[15].



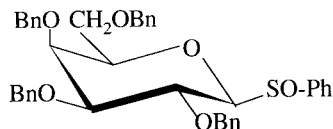
10.3.4 La création de la liaison équatoriale-axiale-1,2

C'est la configuration des β -mannosides. On pourrait imaginer les obtenir par une substitution S_N2 des halogénures α -manno, axiaux et facilement accessibles avec une protection non participante sur O(2). Mais ces dérivés sont peu réactifs, peut-être à cause de la répulsion stérique du groupement axial en 2. On a pu cependant les préparer directement^[16] avec un promoteur insoluble, le dérivé argent de l'échangeur de cations naturel zéolite, par exemple, selon l'équation (10.6). Une autre technique^[17], qui offre un degré élevé de sécurité, consiste à préparer le glycoside β -D-glucosé généralement accessible en rendement élevé par un couplage avec participation et à inverser la configuration en C(2). Dans cette méthode, après la réaction de glycosidation, avec le β -acétate **10.28** en présence de triflate de triméthylsilyle, généralement réalisée avec un rendement élevé, le di (tri) saccharide **10.29** est soumis à une méthanolyse alcaline, suivie de benzyldé-
 nation. On obtient ainsi successivement **10.30** et **10.31**. Il faut un groupement partant particulièrement efficace pour arriver à substituer en C(2). La conversion de **10.31** en imidazolyl sulfonate^[18] déplacée par un benzoate donne **10.32** avec un rendement très élevé.

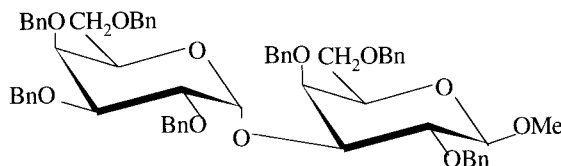


10.3.5 Glycosidation cis-1,2 sans participation avec les sulfoxydes

Cette méthode récente, d'abord décrite par Kahn^[19], a été expérimentée par Matta^[20]. Par exemple, on peut utiliser comme réactif glycosylant le sulfoxyde **10.33**, aisément obtenu par oxydation du phénylthio galactoside perbenzylé au moyen d'un peracide. Le couplage a lieu à -76°C dans le dichlorométhane, en présence d'anhydride trifluorométhanesulfonique et d'une base encombrée. Il ne se



10.33



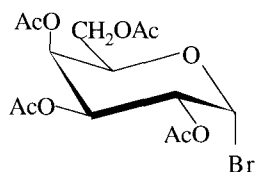
10.34

forme que le glycoside α , en rendement pratiquement quantitatif. Ainsi le couplage sur le méthyl β -D-galactopyranoside protégé par benzylaton, sauf en 3, donne-t-il le disaccharide **10.34** caractéristique du groupe sanguin B (voir le chapitre 16), isolé avec 90 % du rendement. Il n'y a encore que peu d'exemples de cette méthode, qui pourrait se substituer à la méthode à l'ion commun du paragraphe 10.3.3.

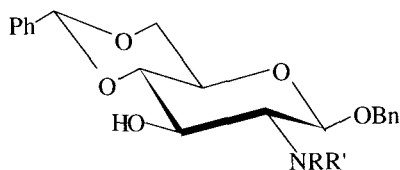
10.3.6 Effet de la configuration de l'accepteur

L'accepteur est confronté à un mélange d'entités potentiellement glycosylantes en équilibre, six — de **10.11** à **10.16** — dans le pire des cas. Le choix de l'une d'elle, qui conditionne le chemin réactionnel ultérieur et l'issue finale dépend de deux facteurs : sa vitesse de disparition par le couplage et sa vitesse de « reformation » par le jeu de l'équilibre. La réactivité de l'hydroxyle vis-à-vis de l'une des entités glycosylantes dépend de sa position dans la molécule d'accepteur et d'effets stériques et électroniques des groupements protecteurs. L'effet stérique (expliqué par la répulsion des orbitales pleines dans la théorie des orbitales moléculaires) semble parfois évident : la condensation du bromure *per*-acétylé **10.35** avec la *N*-acétylglucosamine protégée **10.36** donne le disaccharide β (*trans*-1,2) avec plus de 78 % de rendement^[21]. Cette réaction, effectuée en présence de $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ^[21] est un exemple typique de glycosylation avec participation. Le même donneur, avec la phtalimidoglucosamine **10.37** donne un mélange α , β avec un faible rendement, ce que l'on pourrait interpréter comme l'effet de l'encombrement du groupe phtalimido. Cependant, la réaction, en principe $\text{S}_{\text{N}}2$, avec le trichloracétimide donne 70 % de disaccharide β pur.

Il est nécessaire d'invoquer des facteurs électroniques (modifications de la forme et du niveau d'énergie de la HOMO de la paire libre de l'oxygène) pour expliquer l'effet parfois considérable de modifications éloignées du site de cou-

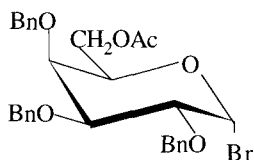


10.35

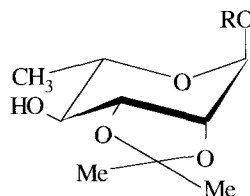


10.36 R= H, R'= Ac

10.37 R,R'= Phthalyl



10.38



10.39 R= Bn

10.40 R= CH₂CCl₃

plage, aussi bien dans le donneur que dans l'accepteur. Par exemple^[6], le couplage du bromure **10.38** avec le benzyl rhamnoside **10.39** donne un mélange α , β , dans le rapport $\alpha/\beta = 19/81$, typique d'une réaction sans participation modérément sélective. Mais le rapport est inversé (81:19) avec le trichloréthyl rhamnoside **10.40**. Il est clair que l'orbitale HOMO du rhamnoside **10.40**, essentiellement la paire libre $2p$ de O(4), a subi une modification d'énergie et peut-être même une certaine délocalisation. Plus généralement, les protections acétates sont plus désactivantes que les protections éther benzylique, au point de rendre parfois le couplage impossible.

Une tentative pour séparer les effets électroniques et stériques repose sur la notion de *stéréodifférenciation*^[22]. Pour en simplifier l'exposé, nous parlerons de l'effet stérique comme d'une interaction entre solides. Supposons que deux entités chirales RXYZ et R'X'Y'Z' se rapprochent pour créer un état de transition, comme sur la figure 10.1, nous imaginons un cas idéal où l'adaptation (la recon-

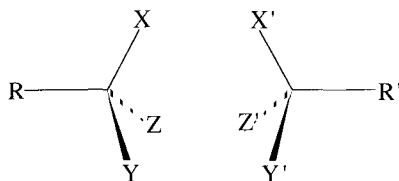


Figure 10.1 Interaction stérique de deux solides chiraux.

naissance) mutuelle est parfaite : à chaque bosse de RXYZ correspond un creux de R'X'Y'Z' et vice versa, si bien que les deux entités peuvent s'approcher suffisamment pour que la liaison s'établisse. Permutons X et Y : ces branches sont différentes, l'adaptation ne peut plus être aussi bonne. Cette permutation donne l'énantiomère ; elle ne change pas l'énergie de l'orbitale frontière. La baisse de réactivité est d'origine stérique. Une observation de ce genre permet de séparer les contributions stériques et électroniques dans la réactivité. Ce raisonnement n'est pas strictement rigoureux. Il n'est valable que si l'orbitale frontière n'est pas chirale. Quoi qu'il en soit, les résultats pratiques sont suggestifs. La réaction du bromure de D-fucopyranosyle perbenzoylé avec l'accepteur **10.42** (Fig. 10.2) en présence de triflate d'argent et de 2,6-di-*tert*-butylpyridine donne un mélange de disaccharides (87 %). On attendrait une réaction avec participation, donnant β pur ; en fait, on a $\alpha/\beta = 2 : 1$. La figure 10.2 montre que l'état de transition avec

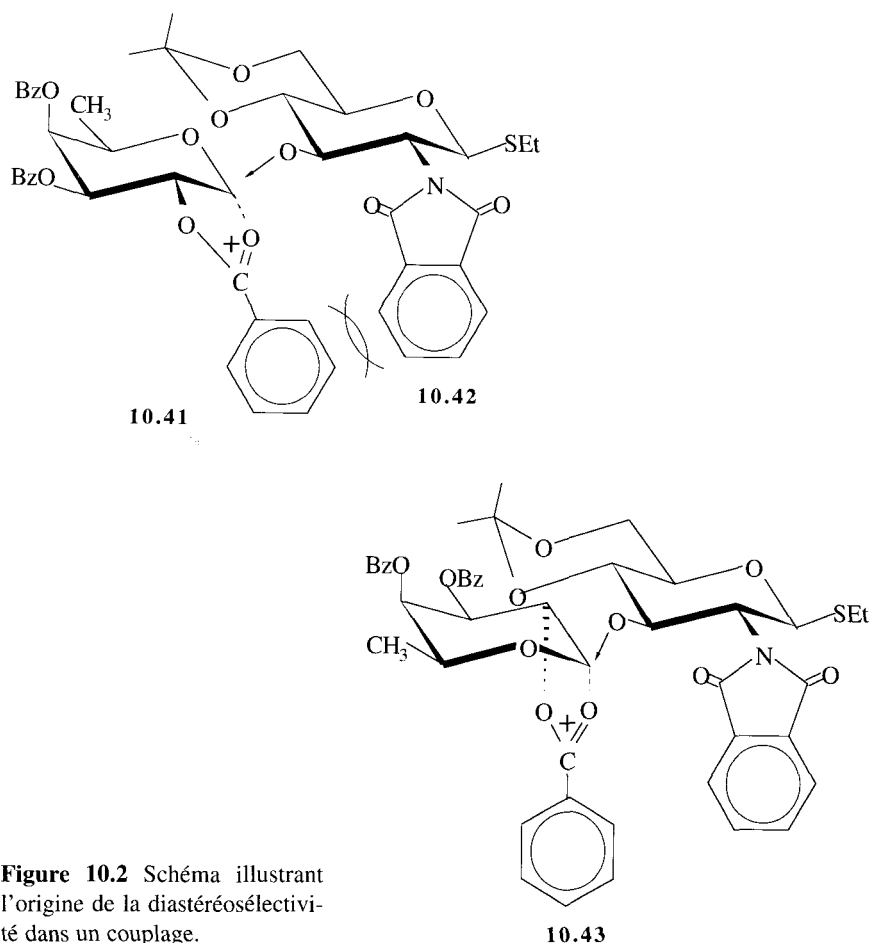
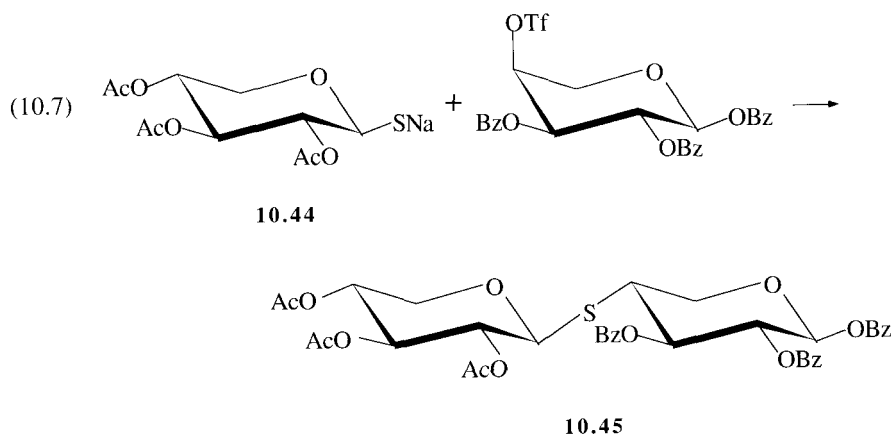


Figure 10.2 Schéma illustrant l'origine de la diastéréosélectivité dans un couplage.

l'intermédiaire de participation **10.41** est très défavorisé. Mais le bromure énantiomère de L-fucopyranosyle donne un intermédiaire **10.43** où l'approche β est moins défavorisée, on observe un rendement de 78 % et un rapport α/β renversé, égal à 1/8,4.

10.3.7 Thiooligosaccharides

Ce sont les analogues des oligosaccharides où l'oxygène interglycosidique est remplacé par du soufre. L'intérêt s'est porté sur ces produits artificiels en raison de leur comportement particulier en chimie enzymatique : résistance à l'hydrolyse enzymatique, inhibition ou induction de glycosidases. On les prépare par substitution nucléophile d'un ester activé (triflate) de l'accepteur par le soufre d'un « thioglycose » activé. La réussite est due au caractère nucléophile élevé du soufre (la synthèse des véritables oligosaccharides de façon analogue a été envisagée^[7] mais ne s'est pas encore généralisée). Naturellement, il y a inversion de configuration sur l'accepteur, qu'il faut choisir en conséquence. Ainsi, le sel de sodium du 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio- β -D-xylopyranose **10.44** conduit au « 4-thioxylobiose » **10.45**. Cette réaction (10.7) est complète en quelques heures à température ordinaire en présence d'un agent de complexation du sodium, avec 92 % de rendement après isolement^[23]. On passe au thiodisaccharide libre par méthanolyse alcaline.



10.4 MÉTHODES ENZYMATIQUES^{[24] [25]}

10.4.1 Réaction de la galactosyltransférase

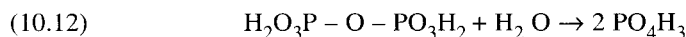
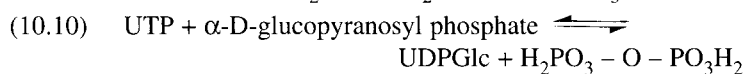
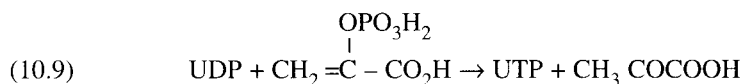
Le chimiste organicien non prévenu risque d'imaginer les enzymes comme des produits dont l'isolement demande un immense entraînement, très fragiles à l'état pur et très coûteuses sur les catalogues et servant d'ailleurs essentiellement à démontrer des voies métaboliques, à l'échelle de la micro-, ou de la nanomole.

Les perspectives sont désormais différentes. Les techniques d'immobilisation permettent de les utiliser plusieurs fois — et dans les meilleures conditions — et le clonage ouvre le chemin de la production massive. Le chimiste organicien qui ne suit pas attentivement le développement de cette nouvelle classe de réactifs risque de voir le résultat de ses efforts réduit à zéro par de brillants raccourcis synthétiques. Enfin, il est très important de noter que, contrairement à ce que l'on pourrait imaginer, lorsque les réactions enzymatiques sont utilisables, elles permettent de préparer les oligosaccharides à une échelle considérablement plus élevée que les méthodes de couplage purement chimiques.

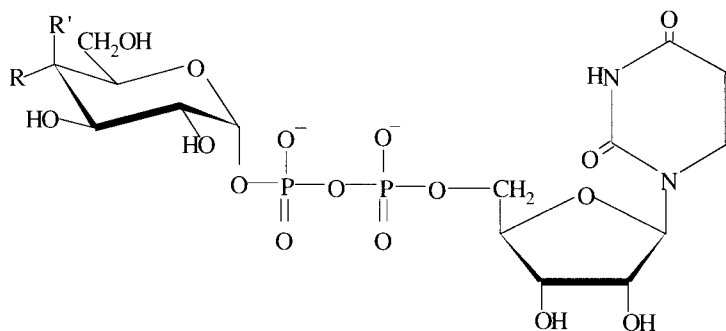
Nous étudierons d'abord un exemple particulier, la synthèse de la *N*-acétyllactosamine par couplage du galactose sur la *N*-acétylglucosamine. La forme activée du galactose est un « nucléotide-sucre », un pyrophosphate d'uridine et de galactose, UDPGal (**10.46**). Le couplage (10.8) est catalysé par l'enzyme galactosyl transférase, présente dans le colostrum de vache.



Sous cette forme, cette réaction n'a pas de valeur préparative, car elle consomme un équivalent de UDPGal, un produit très coûteux. Il faut donc l'associer à la régénération de UDPGal, qui se fait en trois étapes.



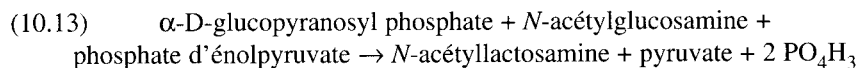
La réaction (10.9) est une phosphorylation de phosphate, catalysée par l'enzyme pyruvate kinase (PK). La réaction (10.10) est la synthèse du « nucléotide-glucose » UDPGlc, uridine diphosphate glucose (**10.47**) à partir du triphosphate, catalysée par l'enzyme UDP-pyrophosphorylase (UP). La réaction (10.11) est l'épimérisation du nucléotide-glucose en nucléotide-galactose. On remarquera



10.46 R= H, R'= OH

10.47 R= OH, R'= H

que la nature préfère fabriquer UDP Glc et l'épimériser plutôt que fabriquer directement UDP Gal. L'enzyme est une épimérase (E). Comme la réaction (10.10) est réversible, on déplace l'équilibre vers la droite avec une cinquième enzyme, la pyrophosphatase inorganique, qui élimine le pyrophosphate du milieu en catalysant son hydrolyse en phosphate. La somme des réactions (10.8) à (10.12) donne le bilan de l'opération (10.13).



On voit que la source d'énergie primordiale est le phosphate d'énol pyruvate, composé facilement accessible en grande quantité par synthèse chimique. De même, l'origine du résidu galactopyranosyle, qui est l' α -D-glucopyranosyl phosphate, **10.48**, est également accessible sans problèmes. On voit aussi que les divers nucléotides ne jouent qu'un rôle catalytique. Or toutes les enzymes concernées sont actives au pH8 ; on peut donc mélanger substrat et enzymes dans le même récipient et réaliser un cycle où le seul nucléotide ajouté est UDP Glc en quantité catalytique (2 %, mol/mol). Ce cycle fabriquera de la N-acétyllactosamine selon l'équation (10.13) jusqu'à épuisement des substrats (Fig. 10.3)^[26].

Aucune des enzymes de ce système n'est très difficile à obtenir. Cependant il est avantageux de les immobiliser sur un support insoluble. Comme support, l'agarose, polysaccharide naturel, à base de D-galactose et de 3,6-anhydro-L-galactose, est particulièrement bien adapté au travail à l'échelle du laboratoire. Le

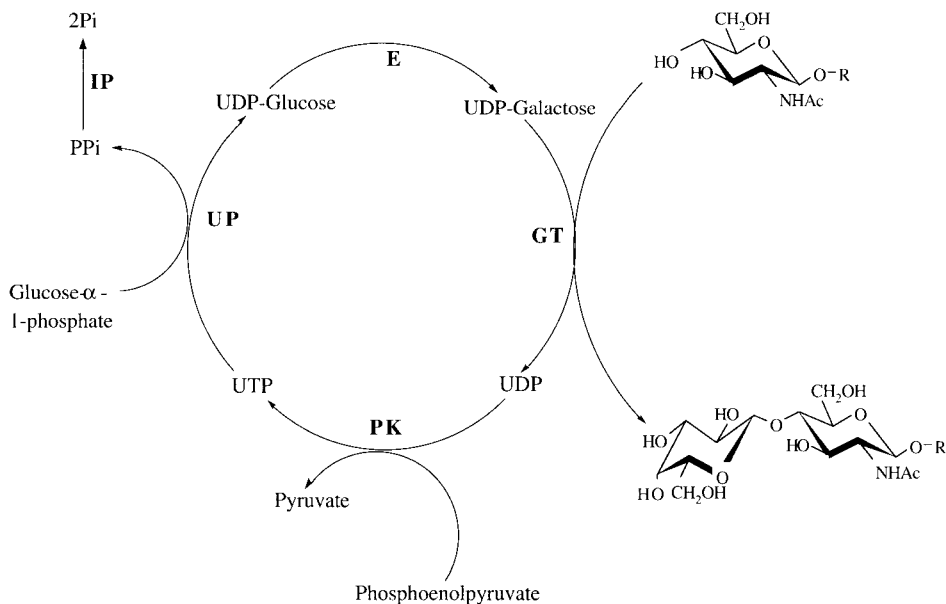


Figure 10.3 Cycle de galactosylation enzymatique.

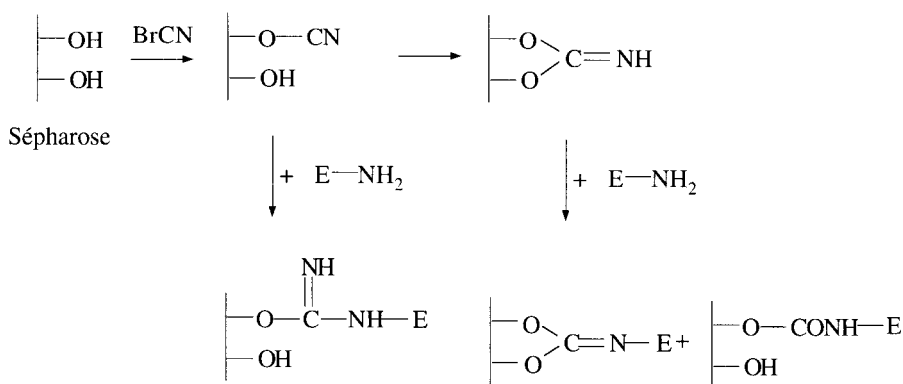
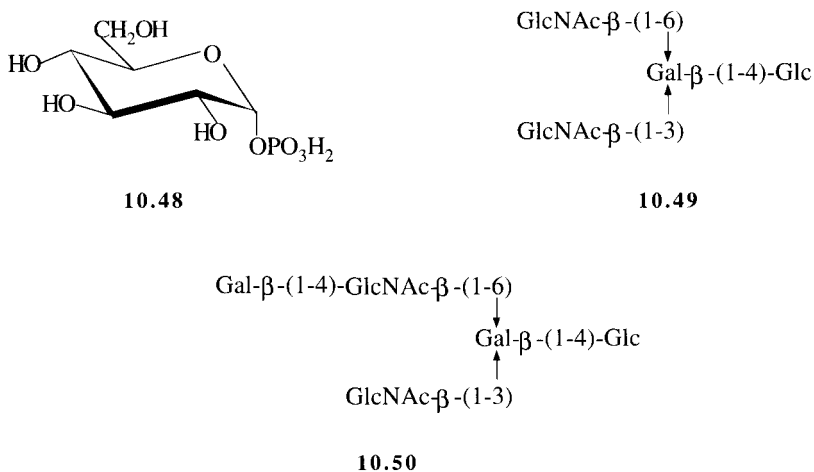


Figure 10.4 Mécanisme proposé pour l'immobilisation d'une enzyme E-NH₂ sur agarose avec l'aide du bromure de cyanogène.

support est d'abord activé avec du bromure de cyanogène. La figure 10.4 donne le mécanisme de l'activation d'un système cis-diol et de son couplage sur l'enzyme symbolisée par E-NH₂ par l'intermédiaire de ses fonctions amines. Les couplages impliquent probablement la formation d'isoürées ou d'imidocarbonates. L'activité enzymatique est dès lors solidaire d'un gel insoluble. On mélange dans le réacteur les cinq gels, qu'il faut maintenir en suspension par agitation, et, une fois la réaction terminée, on récupère par filtration le mélange de gels enzymatiques, utilisable à une nouvelle galactosylation. On préparera finalement 10 g de disaccharide et l'extension à 100 g ou plus poserait peu de problèmes.

Ce système a permis la galactosylation d'un grand nombre de dérivés de la *N*-acétylglucosamine. Quand le substrat est le tétrasaccharide ramifié **10.49** qui comporte deux résidus *N*-acétylglucosaminyl galactosylables, le couplage a lieu exclusivement sur l'une des branches, pour donner **10.50**.



10.4.2 Généralisation

Le paragraphe précédent nous a permis de voir les données essentielles des couplages avec les transférases.

a) L'activation de la position anomérique du monosaccharide résulte de son estérification par un groupement phosphate d'un nucléotide. Sept nucléotides sucres sont fréquents chez les mammifères : UDP Glc, UDP Gal, UDP GlcNAc, UDP GlcUA (uridine - diphosphate - acide glucuronique), GDPMan (guanosine-diphosphate-mannose), GDPFuc (guanosine-diphosphate-fucose), CMP NeuAc (cytidine monophosphate acide N-acétylneuraminique). Les nucléotides-sucres sont très coûteux et il faut tâcher de mettre au point un cycle de régénération.

b) La réaction est catalysée par une glycosyl transférase. Celle-ci a une double spécificité : elle fonctionne avec un nucléotide sucre particulier et elle le transfère sur une position déterminée d'un sucre particulier.

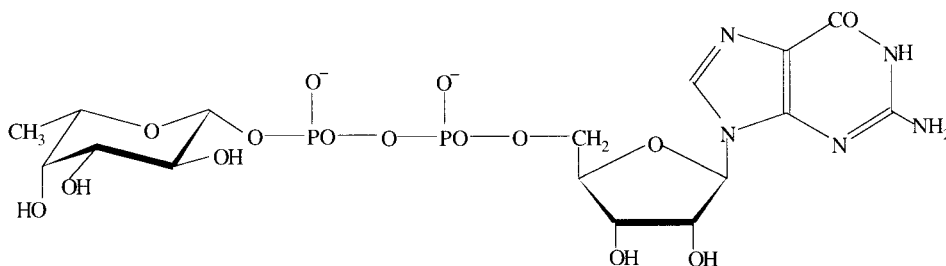
c) Pour cette raison, *le couplage enzymatique est un couplage sans protections*. La simplicité des opérations permet de travailler à une échelle beaucoup plus élevée que dans les méthodes sans enzymes.

d) Dans le cas où le couplage est essayé sur l'unité terminale non réductrice d'une chaîne d'oligosaccharide, la nature de cette chaîne, même à distance, peut modifier l'efficacité de l'enzyme. Nous avons vu que la vitesse de glycosidation est nulle sur une des branches du tetrasaccharide **10.49**. Inversement, elle est 5 fois plus grande sur le chitobiose, GlcNAc - β - (1-4)-GlcNAc que sur GlcNAc.

En plus de la galactosyl transférase du colostrum, sept autres transférases ont été clonées et peuvent donc être obtenues à partir de cellules en culture. Le coût de ces enzymes restera sans doute pour un certain temps assez élevé, reflétant la longueur de la mise au point du clonage. En fait, on peut réaliser des synthèses efficaces avec des préparations enzymatiques partiellement purifiées extraites d'organes de mammifère (foie, rein, cerveau) achetés dans une boucherie.

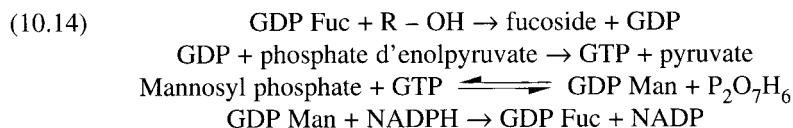
Fucosyl transférases

Elles utilisent GDPFuc, **10.51**, qui a la réputation de n'être pas très commodément accessible par aucune méthode. On a proposé^[25] une fucosylation avec régénération calquée sur une des voies de biosynthèse du fucose, selon la suite de réactions (10.14), dont l'analogie avec la suite de réactions (10.8) à (10.11)



10.51

n'échappera pas au lecteur. L' α -D-mannopyranosyl phosphate est rapidement préparable par voie non enzymatique.

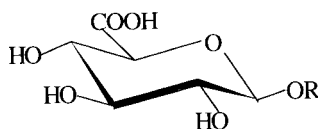


Comme dans la galactosylation, il faut prévoir l'hydrolyse du pyrophosphate. Une nouveauté, c'est que la conversion mannose $\rightarrow$ fucose implique une réduction, qui a lieu avec le réducteur cellulaire universel, NADPH, nicotinamide adénine diphosphate sous forme réduite. Il faut donc prévoir un cycle adventice pour sa régénération, ce qui amène à six le nombre total d'enzymes mélangées.

Il existe deux fucosyl transférases impliquées dans la biosynthèse des substances de groupes sanguins (voir le chapitre 16). Une α -1,2-fucosyltransférase introduit une unité α -L-fucopyranosyl en position 2 d'une unité β -D-galactopyranosyl terminale non réductrice. Une autre, la α -1,3/4-fucosyltransférase a été clonée. Elle introduit une unité α -L-fucopyranosyl soit en 4, soit en 3 du galactose, respectivement, dans les unités terminales non réductrices Gal- β - (1-3)-GlcNAc et Gal- β - (1-4)-GlcNAc

Glucuronyl transférase

Les β -D-glycosides de l'acide glucuronique **10.52**, sont fabriqués par les organismes supérieurs au cours du processus dit « détoxification », pour faciliter l'élimination d'une aglycone étrangère. Le nucléotide-sucré est alors UDP GlcUA. La glycosylation enzymatique libère UDP comme sous produit. Celui-ci est transformé en UDPGlc comme dans le cycle de galactosylation, mais à ce stade, au lieu de l'épimérisation en UDPGal, on produit une oxydation enzymatique de la fonction alcool primaire en carboxyle avec NADP comme oxydant. Celui-ci est réduit et doit être régénéré.



10.52

On a utilisé aussi en synthèse une glucosyl transférase et des *N*-acétylglucosaminyl transférases. On traitera des sialyltransférases dans le chapitre 12 consacré aux acides sialiques.

10.4.3 Glycosidases

Nous avons décrit au paragraphe 3.5.2 l'emploi des glycosidases à la préparation des alkyl glycosides. L'enzyme capable d'hydrolyser un glycoside peut aussi

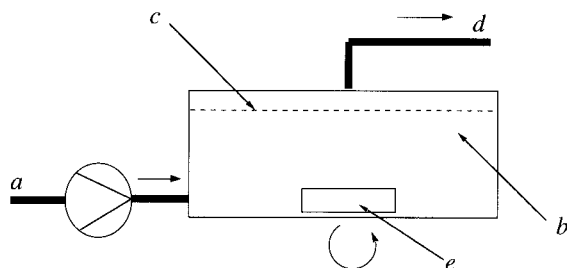
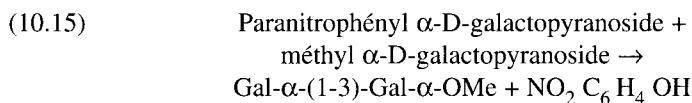


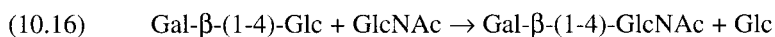
Figure 10.5 Réacteur à membrane. *a.* entrée, *b.* chambre de réaction, *c.* membrane semi-perméable, *d.* sortie, *e.* agitateur.

transférer l'unité glycosyle sur un hydroxyle d'un autre sucre, donnant un disaccharide avec la même anomérie. Cette certitude est déjà un avantage considérable, étant donné le prix généralement peu élevé des glycosidases et l'absence de protection. Ainsi, en présence d' α -galactosidase, on a la réaction (10.15).



Le rendement est de 28 % par rapport au glycoside donneur, ce qui est remarquable, car ce disaccharide important est difficilement accessible par d'autres voies^[24]. Toutefois, il faut utiliser un gros excès d'accepteur et la séparation du produit est extrêmement laborieuse. Les rendements sont en général plus faibles dans les autres conversions de ce type.

Une β -galactosidase de *Bacillus circulans* peut transférer un résidu β -D-galactopyranosyle du lactose sur la *N*-acétylglucosamine, selon (10.16) :



On a utilisé récemment cette enzyme très stable et très peu couteuse à une synthèse *en continu* de la *N*-acétyllactosamine dans un « réacteur membranaire ». Dans ces réacteurs, une des parois de la chambre de réaction est semi-perméable et retient l'enzyme, en laissant passer les produits (Fig. 10.5). Le mélange de réactifs en solution aqueuse arrive par *a*, reste un temps τ au contact de l'enzyme, puis est chassé vers l'extérieur en *d* par l'arrivée d'une nouvelle charge. Un problème important de cette technologie est la détermination de la valeur optimum de τ — dans le cas présent pour limiter les hydrolyses parasites. Dans l'expérience décrite, une chambre de 10 mL, contenant 30 mg d'enzyme est traversée en 100 h par 2,6 L d'une solution de lactose (120 mM) et de *N*-acétylglucosamine (300 mM), avec τ égal à 0,25 h ou 0,5 h. On obtient 11,3 g de *N*-acétyllactosamine^[27]. On peut augmenter l'échelle sans diminuer le rendement.

10.5 FLUOROHYDROLYSE^[28]

Le traitement de la chitine **10.53**, $[\beta\text{-D-GlcNAc}p\text{-(1-4)}]_n \beta\text{-D-GlcAc}$, (n très grand) de la carapace des crustacés par le fluorure d'hydrogène liquide pur à 0°C donne quantitativement une collection d'oligomères **10.54**, $[\beta\text{-D-GlcNAc}p\text{-(1-4)}]_n\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}p\text{-(1-F)}$, ($n = 1\text{-}11$). La réaction est préparative. Ces oligomères jouent un rôle dans les interactions de reconnaissance entre les plantes supérieures et leurs hôtes, symbiotiques ou parasitiques.

RÉFÉRENCES

- [1] R. Kuhn et W. Kirschenlohr, *Annalen*, 600 (1956) 135-143.
- [2] J. Alais et A. Veyrières, *Carbohydr. Res.*, 93 (1981) 164-165.
- [3] J. D. Stevens, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 490-492.
- [4] L. Hough, A. C. Richardson et L. A. W. Thielwall, *Carbohydr. Res.*, 75 (1979) C11-C10.
- [5] J. Alais, A. Maranduba et A. Veyrières, *Tetrahedron Lett.*, (1983) 2383-2386.
- [6] H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21 (1982) 155-173.
- [7] R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 25 (1986) 212-235.
- [8] P. J. Garregg et A. A. Lindberg, dans *Carbohydrate Chemistry* publié sous la direction de J. F. Kennedy, Clarendon Press, Oxford 1988, Chap. 12, p. 500-526.
- [9] S. Hanessian et J. Banoub, *Carbohydr. Res.*, 53 (1977) C-13.
- [10] A. Lubineau et A. Malleron, *Tetrahedron Lett.*, 26 (1985) 1713-1716.
- [11] U. Nilsson, A. K. Ray et Göran Magnusson, *Carbohydr. Res.*, 208 (1990) 260-263.
- [12] M. Kiso et L. Anderson, *Carbohydr. Res.*, 136 (1985) 309-323.
- [13] A. Lubineau, J. Le Gallic et A. Malleron, *Tetrahedron Lett.*, 28 (1987) 5041-5044.
- [14] J. M. Pougny, M. A. M. Nassr, N. Naulet et P. Sinaÿ, *Nouv. J. Chem.*, 2 (1978) 389-395.
- [15] R. U. Lemieux et R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.*, 57 (1979) 1244-1251.
- [16] P. J. Garegg, C. Henrichson, T. Norberg et P. Ossovski, *Carbohydr. Res.*, 119 (1983) 95-100.
- [17] S. David, A. Malleron et C. Dini, *Carbohydr. Res.*, 188 (1989) 193-200.
- [18] S. Hanessian et J. M. Vatile, *Tetrahedron Lett.*, (1981) 3579-3582.
- [19] D. Kahne, S. Walker, Y. Cheng et D. V. Engen, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 6881-6882.
- [20] A. K. Sarkar et K. L. Matta, *Carbohydr. Res.*, 233 (1992) 245-250.
- [21] C. Augé et A. Veyrières, *Carbohydr. Res.*, 46 (1976) 293-298.
- [22] N. M. Spijker et C. A. A. Bockel, *Angew. Chem. Int.*, Ed. Engl. 30 (1991) 180-182.
- [23] J. Defaye, J. M. Guillot, P. Biely et M. Vršanká, *Carbohydr. Res.*, 228 (1992) 47-64.
- [24] S. David, C. Augé et C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 49 (1991) 176-237.
- [25] Y. Ichikawa, G. C. Look et C. H. Wong, *Anal. Bioch.*, 202 (1992) 215-238.
- [26] C. H. Wong, S. L. Haynie et G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 47 (1982) 5416-5418.
- [27] G. F. Herrmann, U. Kragl et C. Wandrey, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 1342-1343.
- [28] J. Defaye, A. Gadelle et C. Petersen, *Carbohydr. Res.* 261 (1994) 267-277.

Associations avec anions, cations et molécules inorganiques

11.1 ASSOCIATION AVEC DES CATIONS MÉTALLIQUES

11.1.1 Introduction

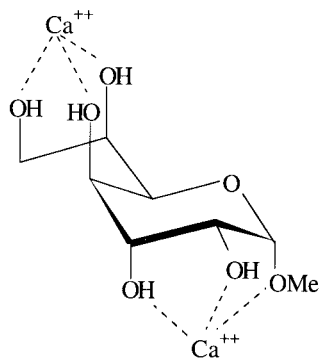
Il est bien évident que dans un mélange de sucres et de sels en solution, il y aura toujours au moins une association lâche entre les hydroxyles et les cations métalliques. De même, lorsqu'on cristallise un sucre à partir d'une solution concentrée en sels, l'examen aux rayons X révèle des associations entre le sucre, les cations et des molécules d'eau. Ceci n'est pas réellement significatif de notre point de vue. Par exemple il existe un composé d'addition cristallisé répondant à la formule saccharose $\text{NaBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, alors qu'il n'existe pas d'association visible en solution entre le saccharose et les ions sodium. Nous ne prendrons ici en considération que les associations qui impliquent au moins trois hydroxyles de la même molécule de sucre^[1]. Nous ne traiterons pas des associations en milieu alcalin qui sont en fait des alcoolates. L'examen des structures solides (en nombre limité) donne une base de discussion. Des techniques simples, comme l'électrophorèse sur papier ou la chromatographie sur couche mince d'échangeur cationique ainsi que la spectroscopie RMN, donnent des renseignements sur la complexation en solution.

11.1.2 Structures à l'état solide

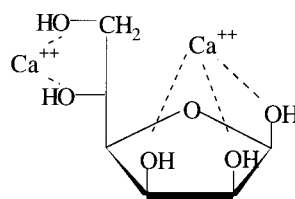
Malheureusement les complexes dont on a pu déterminer la structure solide ne dérivent pas en général des molécules de sucres banales dont la complexation est évidente en solution. Le complexe calcique du méthyl D-*glycero- α -D-gulo*-heptopyranoside, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_7 \cdot \text{Ca}^{2+} \cdot \text{Cl}_2^- \cdot \text{H}_2\text{O}$, **11.1**, nous indique la disposition caractéristique d'un complexe tridenté sur un cycle pyranosique. Le cation est coordonné aux oxygènes O(1), O(2) et O(3) d'une molécule et O(4'), O(6') et O(7') d'une autre molécule. Il y a en plus une molécule d'eau et un chlorure, ce qui amène la coordinence du calcium à 8. On remarquera sur la structure **11.1** la disposition axiale-équatoriale-axiale, *aea*, des ligands O(1), O(2) et O(3). C'est la plus favorable à la complexation sur un cycle pyranosique. La chaîne latérale adopte une conformation qui permet aux hydroxyles O(4), O(6) et O(7) d'avoir la même rela-

tion géométrique mutuelle que O(1), O(2) et O(3). Tous les hydroxyles du sucre sont engagés dans la complexation.

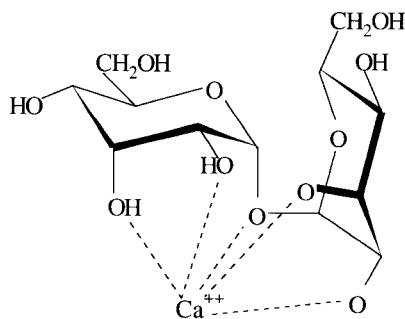
Le complexe β -D-mannofuranose. $\text{Ca}^{++} \cdot (\text{Cl}^-)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (**11.2**) cristallise à partir d'une solution aqueuse très concentrée de mannose en présence d'un excès de CaCl_2 . Il est remarquable que la proportion de β -D-mannofuranose dans l'eau



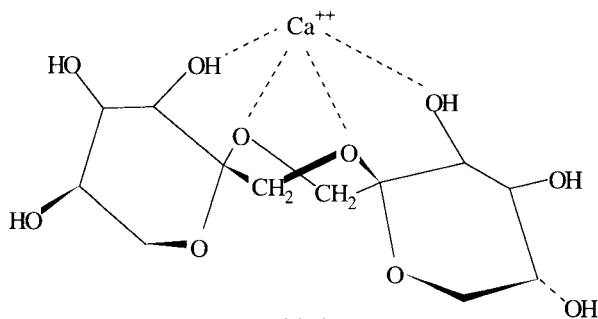
11.1



11.2



11.3



11.4

pure n'est que 0,3 %. La complexation déplace donc notablement l'équilibre tautomérique en solution aqueuse. Le cation est coordonné à O(1), O(2) et O(3) d'une molécule et O(5') et O(6') d'une autre molécule. Trois molécules d'eau amènent à 8 la coordinence de Ca^{++} . Il est impossible de décrire la coordination en fonction d'un polyèdre classique. Ce type de complexation (triol vicinal, *cis-cis*) est caractéristique des complexes des furanoses.

Un monosaccharide ne peut pas fournir plus de trois oxygènes pour se coordonner à un cation, mais avec un disaccharide, on peut observer la coordination avec 4 ou 5 sites. Ainsi le disaccharide non réducteur α -D-allopyranosyl- α -D-allopyranoside présente-t-il la disposition *aea* sur chacune de ses unités monosaccharidiques. Dans le complexe **11.3** avec CaCl_2 et 5 H_2O , Ca^{++} est coordonné à O(1), O(2), O(3), O(2') et O(3'). Quatre molécules d'eau amènent la coordinence à 9, chiffre assez rare. Le β -D-fructopyranose 1,2 ; 1',2'-dianhydride **11.4** se complexe très facilement avec CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 et LaCl_3 . Les hydroxyles engagés sont O(1), O(3), O(1') et O(3').

11.1.3 Complexes en solution

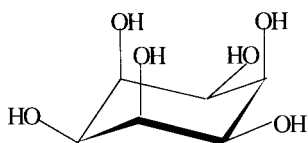
Dans l'*électrophorèse sur papier*, en présence d'un électrolyte support, tous les sucres migrent vers la cathode, ce qui indique qu'une fraction au moins des molécules est complexée aux cations. Ce sont les cations Ca^{2+} , Sr^{2+} et Ba^{2+} qui assurent la plus grande mobilité. La vitesse de migration est une mesure du taux de complexation. La molécule la plus rapide est le *cis*-inositol **11.5**. La coordination fait intervenir les trois hydroxyles axiaux. C'est la disposition qui entraîne la meilleure complexation possible, mais cette molécule n'appartient pas à la famille des sucres et, bien sûr, il n'existe pas de dérivés pyranosiques avec trois hydroxyles axiaux *cis*. Le glucose ne migre presque pas.

On sait préparer des *plaques pour couches minces* à base d'*échangeur de cations*. Il est facile de les faire passer sous la forme métallique désirée (Cu^{2+} , Ca^{2+} , La^{3+} , etc.) en les immergeant dans la solution saline correspondante. Avec l'eau comme irrigant, la migration des sucres sur ces plaques est plus ou moins retardée suivant leur degré de complexation.

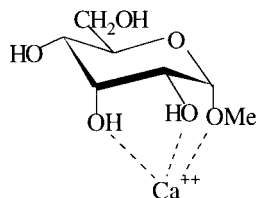
La *résonance magnétique nucléaire* donne des renseignements précis sur la complexation en solution. L'établissement de l'équilibre est rapide à l'échelle de temps de la RMN, on n'observe donc qu'un spectre moyen et il est malaisé de déterminer le spectre du complexe pur. Lors de la complexation d'un sucre ou d'un polyol avec un ion diamagnétique, tous les signaux migrent vers les champs faibles. La formule (11.1) permet de calculer la variation $\Delta\sigma$ de la constante d'écran du proton lorsque la liaison est soumise à un champ électrique E (exprimé en u.e.s.), dont la projection sur la liaison C-H est E_x .

$$(11.1) \quad \Delta\sigma = -2 \times 10^{-12} E_x - 10^{-18} E^2$$

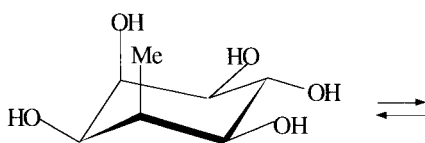
En se reportant à un complexe du type *aea*, par exemple **11.1**, on remarquera que la projection E_x a sa valeur maximale le long de la liaison C-H axiale centra-



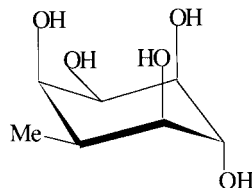
11.5



11.6



11.7



11.8

le et une valeur plus faible sur les C-H équatoriaux. Ceci permet d'identifier le site de complexation. Par exemple, l'addition d'ions calcium modifie le spectre du méthyl α -D-allopyranoside en solution aqueuse et on observe que c'est le signal de H(2) qui est le plus déplacé, suivi par ceux de H(1) et H(3). On en déduit que le complexe a la structure **11.6**. Dans ces expériences, les déplacements des signaux de protons sur les spectres sont de l'ordre de 0,2 p.p.m.

Il y a possibilité de pièges dans ces déductions. La complexation peut entraîner une inversion de conformation du cycle et celle-ci amène une variation de position des signaux beaucoup plus importante que la complexation. Ainsi, par suite de l'équilibre conformationnel **11.7** $\rightleftharpoons$ **11.8**, un polyol cyclohexanique peut présenter deux sites de complexation efficaces, un site *aea* et un site triaxial, qui n'existent pas dans sa configuration la plus stable.

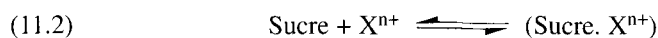
Les déplacements de signaux en présence de cations paramagnétiques sont observés avec les sucres comme avec presque toutes les familles organiques. Ils sont beaucoup plus importants et leur interprétation est beaucoup plus compliquée. Nous considérons que ces phénomènes sont en dehors du cadre de ce chapitre.

Avant même toute détermination de structure solide, l'examen de la mobilité en électrophorèse avait déjà montré que les sucres qui peuvent présenter la séquence *aea* dans l'une de leurs conformations se complexent bien. C'est la disposition la plus favorable ; la disposition triaxiale 1, 3, 5 sur un cyclohexane est encore meilleure mais n'est pas réalisable sur un pyranose. A cette disposition *aea* correspond pour un furanose, la disposition *cis* de trois hydroxyles comme dans le β -D-mannofuranose discuté ci-dessus. Le furanose flexible peut alors prendre une

conformation qui place les hydroxyles dans une situation relative très voisine de la disposition *aea*.

D'une façon générale, la stabilité des complexes augmente suivant la valence des cations, dans l'ordre monovalent < divalent < trivalent, mais il y a un autre facteur, le rayon ionique du cation, dont la valeur optimale se situe entre 100 et 110 pm, comme dans le cas de Na^+ , Ca^{2+} et La^{3+} . Les complexes de Li^+ dont le rayon est 68 pm sont très peu stables. On prédit que Cu^{2+} , de rayon 72 pm, doit être un complexant médiocre et c'est en général vérifié. Cependant il y a de fortes indications qu'il existe une complexation énergétique dans les solutions d'acétate cuivrique. Le complexant réel serait alors $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$.

A l'équilibre de complexation (11.2) correspond une constante d'équilibre K , donnée par l'expression (11.3) ; c'est une mesure de la force de complexation, qu'on appelle *constante de stabilité*.



$$(11.3) \quad K = \frac{[(\text{Sucre} \cdot \text{X}^{n+})]}{[\text{Sucre}] [\text{X}^{n+}]}$$

Avec les sucres, la mesure est imprécise : K est relativement peu élevée. Comme il s'agit de solutions parfois très concentrées, il faudrait introduire les activités qui, pour ces cations complexes, ne sont pas aisément accessibles. Il peut y avoir plusieurs réactions de complexation avec des stœchiométries différentes. On néglige ces sources d'erreur. La méthode de calcul de K la plus directe repose sur un dosage potentiométrique du cation non complexé en solution, en présence de quantités variables de sucre. Lorsque la complexation implique nécessairement un changement de conformation du sucre, qui modifie profondément son spectre de RMN, on peut déduire la fraction de sucre complexée des déplacements de signaux observés sur ce spectre. Avec Ca^{++} , on mesure pour les « bons complexants » des constantes de stabilité voisines de 5 M^{-1} (α -D-allopyranose, 5,1 – 6,5 ; α -D-ribopyranose, 4,6 – 5,5), qui descendent jusqu'à 0,1 pour les « mauvais » complexants comme le méthyl α -D-xylofuranoside. Les constantes de stabilité sont beaucoup plus élevées dans le méthanol ou l'éthanol. Ceci explique le pouvoir dissolvant élevé des solutions alcooliques de certains sels vis-à-vis des sucres, par exemple des solutions alcooliques concentrées de chlorure de calcium.

Parmi les applications, nous avons mentionné la séparation des sucres sur colonne d'échangeur de cations sous forme calcium au chapitre 1, à propos de la HPLC analytique. Signalons qu'on peut séparer le glucose du fructose à l'échelle du kilogramme par cette méthode. Sous sa forme préparative, l'emploi de ces colonnes est très recommandable : elles ont une grande capacité ; elles sont régénérables et l'éluant est l'eau. Il existe aussi des applications en synthèse. L'addition de CaCl_2 à une solution aqueuse de sucre augmente la proportion de tautomères pyranoses présentant une disposition *aea* dans une de leurs conformation et de tautomères furanoses présentant une disposition triol contigu *cis, cis*. On

peut ainsi changer radicalement le cours de la glycosidation de Fischer (voir le paragraphe 3.3) et l'orienter vers la production majoritaire de furanosides, en général mal accessibles par d'autres méthodes. Ainsi le rendement en méthyl α -D-ribofuranoside passe-t-il de 4 à 69 %.

11.2 NOTIONS SUR LA STRUCTURE DE L'EAU LIQUIDE

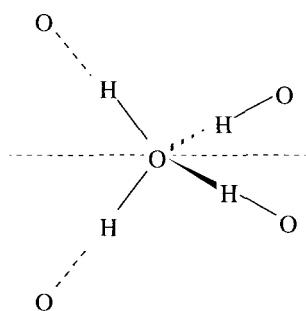
11.2.1 Introduction

La connaissance de la structure de l'eau est surtout importante pour comprendre son interaction avec les sucres dont l'étude est reportée en fin de chapitre, pour des raisons qui seront exposées en leur temps. Cependant, comme le concept d'interaction hydrophobe apparaît plusieurs fois dans les paragraphes 11.3 et 11.4, il vaut mieux que le lecteur soit d'emblée familier avec lui.

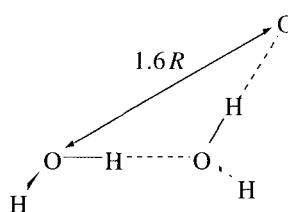
11.2.2 Structure de l'eau^[2]

Dans la glace, chaque molécule d'eau est l'accepteur de deux liaisons hydrogènes assurées par les protons de deux molécules d'eau voisines. La configuration autour de chaque atome d'oxygène est celle d'un tétraèdre régulier, **11.9**. Ces tétraèdres sont assemblés pour donner un cristal de type tridymite. Celui-ci contient des cavités notables en raison de la longueur des liaisons oxygène-oxygène par l'hydrogène, qui constituent l'arête des polyèdres.

Dans l'eau liquide, en raison de l'agitation moléculaire, on ne peut plus assigner une position fixe aux atomes, ni la déterminer avec précision par diffraction de rayons X ou de neutrons. Mais lorsqu'on emploie ces mêmes méthodes avec de minces lames de liquide, on peut calculer à partir des images de diffraction *une fonction de distribution radiale $g(r)$* qui est une mesure de la probabilité de trouver un atome d'oxygène j à la distance r d'un atome d'oxygène i . Cette fonction, représentée à la figure 1, montre qu'il y a une forte probabilité de trouver dans

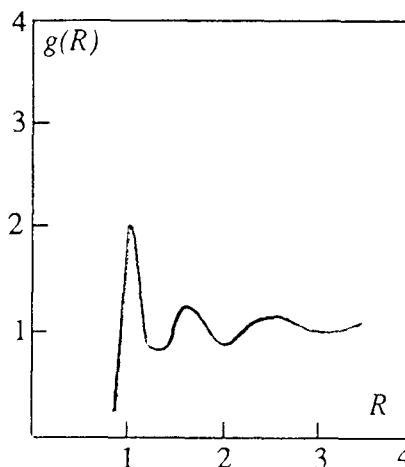


11.9



11.10

Figure 11.1 Fonction de distribution radiale dans l'eau liquide. Ordonnées : $g(R)$; abscisses : distances à un oxygène particulier, comptées en diamètre de Van der Waals de la molécule d'eau.



l'eau liquide un deuxième atome d'oxygène à la distance R voisine du diamètre de Van der Waals de la molécule d'eau, 282 pm, et une probabilité plus faible d'en trouver un troisième à la distance $1,6 R$. Puis la fonction s'amortit rapidement, ce qui indique que l'atome d'oxygène i considéré ne conditionne plus l'ordre à grande distance. Les deux pics observés témoigneraient de la persistance dans l'eau liquide d'associations selon le modèle 11.10 avec la configuration tétraédrale. En intégrant la fonction de distribution de 0 à r , on calcule le nombre $n(r)$ de voisins immédiats, selon la relation (11.4), où ρ désigne la densité. On trouve qu'un atome d'oxygène est entouré par 4,4 atomes d'oxygène voisins immédiats. Il y a donc un certain degré d'organisation.

$$(11.4) \quad n(r) = \rho \int_0^r 4 \pi g(r) r^2 dr$$

Il y a certainement les modes d'association les plus variés dans l'eau liquide, mais on pense qu'il y a, en particulier, des cavités plus grandes que dans la glace. Lorsque l'on refroidit les solutions aqueuses de gaz inertes ou d'hydrocarbures (évidemment très diluées !), il se dépose ce que l'on appelle un *clathrate* : dans cet édifice, le soluté, si ses dimensions le permettent, est emprisonné dans un dodécaèdre régulier constitué par des molécules d'eau. On pense que ce type de cage et d'autres plus grandes préexistent dans l'eau pure. Naturellement, elles se disloquent et se reforment constamment, puisque la durée de vie d'une liaison hydrogène dans l'eau est de l'ordre de 10^{-10} seconde. Le volume total, eau plus futur soluté, *diminue* lors de la dissolution, ce qu'on interprète en supposant que le soluté occupe simplement des volumes primitivement vides. Les grandeurs thermodynamiques associées au transfert d'une molécule de méthane, par exemple, d'un solvant organique à l'eau s'accordent avec cette interprétation.

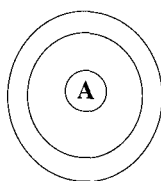
L'enthalpie libre est positive (l'eau est un très mauvais solvant pour le méthane !), mais en fait l'enthalpie liée est négative (réaction exothermique) et c'est une forte diminution d'entropie qui renverse la tendance. Ceci révèle une augmentation de l'ordre dans le système. On se représente le soluté, quand il est loin de la saturation, comme entouré par une sphère de molécules d'eau, qui dirigent leurs liaisons O-H tangentiellement dans la mesure du possible, de façon à s'éloigner de la molécule de soluté, **11.11**. On a formulé l'opinion que ceci impliquait une certaine rigidification de la structure de l'eau. Si l'on augmente la concentration, deux molécules A et B se rapprochent et finissent par se réunir dans une même cavité de plus grande dimension, **11.12**. Ceci est un processus favorable car l'interface eau-hydrocarbure s'en trouve diminué. Ces phénomènes caractérisent l'*hydratation hydrophobe*.

11.3 CYCLODEXTRINES^[3]

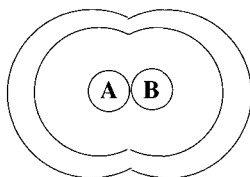
Nous commençons maintenant l'étude d'une famille de molécules complexes qui sont sur le papier des produits de polycondensation de l' α -D-glycopyranose, répondant à la formule générale **11.13**.

On y trouve des polysaccharides linéaires ($R = H$, $R' = OH$) mais nous commencerons par des oligosaccharides cycliques, les cyclodextrines. En effet, leurs propriétés sont souvent connues avec précision et elles peuvent servir de modèle pour comprendre le comportement de l'amylose (voir le paragraphe 11.4) en dépit d'une indiscutable différence de forme. Ce sont des oligomères cycliques bâtis à partir d'unités α -D-glucopyranosyl reliées en $1 \rightarrow 4'$. Les trois plus importantes, les α , β et γ -cyclodextrines sont constituées à partir de 6, 7 et 8 unités α -D-glucopyranosyl en conformation habituelle D^4C_1 . Les anneaux ont la forme d'un tronc de cône, avec les fonctions alcool primaire sur la petite base et les fonctions alcool secondaire sur la grande base. La structure **11.14** est celle de la β -cyclodextrine, présentement la plus utilisée. La cavité intérieure est tapissée par les hydrogènes liés aux carbones 3 et 5 et les oxygènes glycosidiques. Elle apparaît essentiellement hydrophobe. La conformation est stabilisée par des liaisons hydrogène entre deux hydroxyles voisins de deux unités α -D-glucopyranose adjacentes. Les dimensions de la cavité sont de l'ordre de 470-520 pm pour l' α -cyclodextrine, 600-640 pm pour la β -cyclodextrine et 750-830 pm pour la γ -cyclodextrine. Il est remarquable que la β -cyclodextrine soit relativement peu soluble dans l'eau (18,5 g/L), tandis que l' α - et la γ -cyclodextrine sont respectivement huit et douze fois plus solubles.

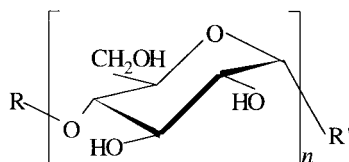
Les cyclodextrines sont les produits de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. On les sépare à l'état de complexes précipitants avec certains solvants et on les purifie par recristallisation. Il serait probablement possible d'en fabriquer industriellement un fort tonnage. La formation des cyclodextrines est interprétée comme un *trans* glycosidation sous contrôle enzymatique de l'amylose. Celle-ci, en solution aqueuse, adopte au moins partiellement la forme



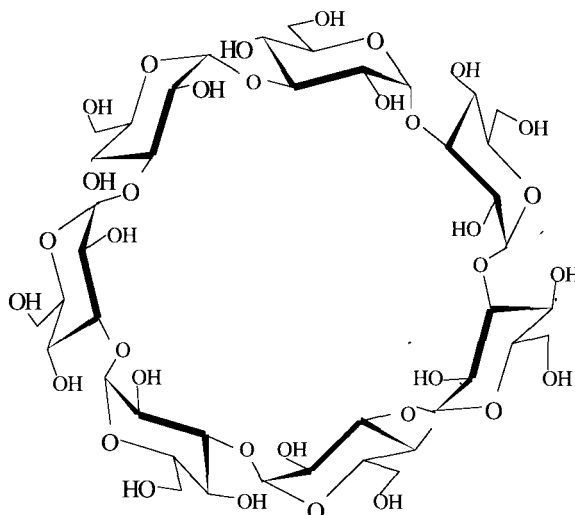
11.11



11.12



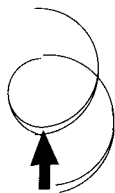
11.13



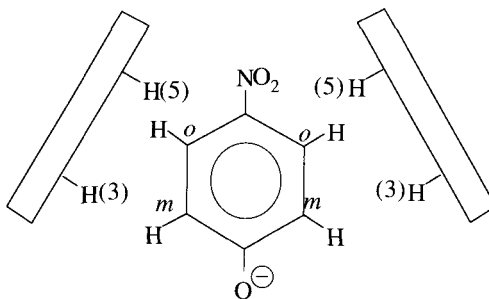
11.14

d'une hélice, avec une période de six unités glucopyranose. L'enzyme bactérienne catalyse la jonction de deux résidus glucopyranose, séparés par quatre, cinq ou six résidus sur la chaîne, mais en proximité spatiale à cause de la structure en hélice **11.15**.

La propriété la plus caractéristique des cyclodextrines est leur aptitude à former des complexes d'inclusion en solution aqueuse avec des molécules de dimension inférieure à celle de leur cavité. Ceci est visible, entre autres, dans les expériences de RMN. Ainsi l'addition de l' α -cyclodextrine à l'anion paranitrophénate en solution aqueuse (pD $\approx$ 11) déplace de 14-35 Hz les signaux de protons aromatiques examinés à 100 MHz. L'étude du déplacement en fonction de la concentration permet de calculer une constante de dissociation du complexe, $K_D = 3,7 \times 10^{-4}$ M. On trouve des valeurs du même ordre en analysant l'évolution d'autres propriétés physiques^[4]. On peut déterminer le site de complexation sur la cyclodextrine en utilisant l'effet Overhauser nucléaire du proton^[5]. Rappelons que la



11.15



11.16

relaxation mutuelle de deux protons dépend de leur distance r selon une loi en r^{-6} . La proximité spatiale de deux protons se traduit donc par une augmentation de l'intensité du signal. L'expérience décrite repose sur ce principe, mais fait appel à une technique plus sophistiquée de RMN à deux dimensions. La solution examinée est 40 mM en α -cyclodextrine et 80 mM en paranitrophénate, dans D_2O (pD 10), et au moins 95 % de la cyclodextrine est complexée. On montre qu'il y a proximité des H(3) de la cyclodextrine avec les protons *ortho* (o) et *méta* (m) du paranitrophénate et des H(5) avec les protons *méta* seulement. Ceci indique que le phénate est à l'intérieur de la cavité, avec la disposition schématisée par la formule **11.16**.

Il y a de nombreuses autres méthodes pour mettre en évidence la complexation. Par exemple, il est bien connu que les protons situés au voisinage de l'axe C_6 d'un noyau aromatique donnent des signaux en RMN déplacés vers les champs forts, parfois jusqu'à des valeurs négatives de δ . L'inclusion d'une molécule aromatique dans une cyclodextrine produit cet effet sur les signaux de H(3) et H(5). Mais il est relativement faible (-0,2 p.p.m.)^[6]. Plusieurs autres méthodes d'investigations sont possibles : les modifications du spectre électronique, l'augmentation de la fluorescence de l'hôte, qui dans la cavité est protégé contre le choc des molécules extérieures, les changements dans le dichroïsme circulaire. On observe aussi une augmentation de la solubilité des substances peu solubles dans l'eau. Dans la liste des molécules complexées on trouve des alcools et des acides carboxyliques aliphatiques à bas poids moléculaire, les acides cyclohexane- et adamantane-carboxyliques, des benzènes substitués par des groupements fonctionnels variés, des hétérocycles (pyridines, pyrimidines, indoles) et enfin des sels inorganiques.

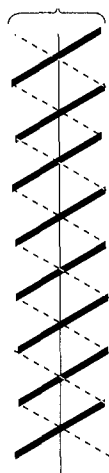
Il ne semble pas qu'on soit encore arrivé à une explication définitive du mécanisme d'inclusion. Dans l'expression de l'enthalpie libre de la complexation, le terme d'enthalpie liée est négatif, assez variable, de l'ordre de 20 kJ mol⁻¹, mais sa contribution est diminuée par un terme entropique presque toujours positif. Ce comportement uniforme de molécules hôtes de structures extrêmement variées par ailleurs suggère un mécanisme commun de complexation. On a vu ci-dessus que deux molécules de soluté hydrophobe, A et B, **11.11** et **11.12**, ont tendance à se

rejoindre en chassant les molécules d'eau qui les séparent. Ici l'intérieur hydrophobe de la cavité de la cyclodextrine joue le rôle de la molécule A et l'hôte B vient à son contact en chassant tout ou partie des molécules d'eau qui occupent normalement cette cavité. Il semble probable que la complexation est aussi due à la participation de forces de Van der Waals, en proportion variable suivant la configuration de l'hôte.

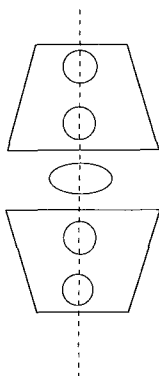
Actuellement on poursuit activement l'exploration des propriétés des cyclodextrines. En raison de leur absence de toxicité et de leur aptitude à complexer leurs hôtes dans l'eau, on peut imaginer des applications dans l'industrie pharmaceutique pour l'administration de médicaments insolubles. Elles peuvent jouer un rôle catalytique. Ainsi la β -cyclodextrine accélère-t-elle la cycloaddition du cyclopentadiène avec l'acrylonitrile par inclusion simultanée des deux molécules. On cherche à modifier les propriétés complexantes en utilisant les hydroxyles pour accrocher des groupes supplémentaires. En introduisant un groupement fonctionnel basique faible près de la cavité réceptrice, on a bâti une enzyme hydrolase artificielle. Enfin, les cyclodextrines étant des molécules chirales, on s'attend à observer une résolution plus ou moins efficace des hôtes racémiques. C'est ce qu'on a observé parfois et on a même bâti des colonnes chirales à base de cyclodextrine immobilisée. Il ne semble cependant pas que les cyclodextrines se soient imposées comme réactifs de dédoublement.

11.4 AMYLOSE

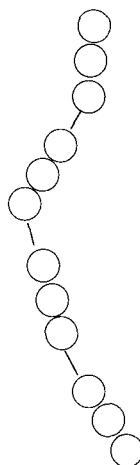
L'amidon, substance de réserve des graines de végétaux est un mélange de deux polysaccharides, l'amylose et l'amylopectine^[7]. L'amylose est linéaire, avec comme motif périodique l' α -D-glucopyranose, lié comme sur la formule **11.13** ($R = H$, $R' = OH$), n étant fréquemment de l'ordre de 6 000. En revanche, l'amylopectine est un polysaccharide ramifié, où des chaînes analogues, mais beaucoup plus courtes — de 17 à 26 unités — sont reliées entre elles par des liaisons 1-6'. On sépare ces deux constituants par traitement d'une dispersion aqueuse d'amidon (l'empois) par des composés organiques hydroxylés comme le thymol et le butanol primaire qui forment des complexes insolubles avec l'amylose. L'amylopectine reste en solution et nous n'en parlerons plus. En ce qui concerne l'amylose, on peut préparer plusieurs variétés cristallisées, selon les conditions du dépôt à partir d'une solution aqueuse. La structure de base des amyloses A et B est une double hélice^[8], constituée par l'enroulement l'une avec l'autre de deux chaînes *parallèles*, chacune ayant la forme d'une hélice à droite **11.17**. Un tour complet correspond à six unités glucopyranosiques pour chaque brin. Les amyloses A et B diffèrent par l'organisation dans la maille cristalline. Le pas de l'hélice dans l'amylose B est 2 080 pm. Les amyloses V qui précipitent en présence de complexant comme le diméthylsulfoxyde ou le butanol primaire sont des hélices simples, également avec une répétition de six unités α -D-glucopyranosyl, peut-être un peu moins régulière. La variété V_h est une hélice à gauche^[9]. En solu-



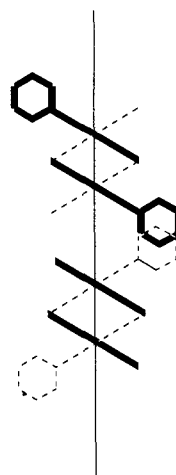
11.17



11.18



11.19



11.20

tion, l'amylose aurait la conformation d'une hélice, simple ou double, probablement assez relâchée, ou de pelotes désordonnées. La conformation hélicoïdale reproduit dans une certaine mesure le vis-à-vis des surfaces hydrophobes caractéristique des cyclodextrines. On peut imaginer qu'elle évite ou restreint la formation de la couche aqueuse hydrophobe qui entoure normalement dans l'eau les molécules non polaires. On pourrait hasarder l'expression « autocomplexation ». En revanche, l'hélice présente des groupements polaires vers la masse du solvant.

11.5 COMPLEXES IODÉS

11.5.1 Introduction

La coloration bleue de l'amidon avec l'iode, bien connue des lycéens, a été observée pour la première fois il y a bientôt 200 ans. C'est la fraction amylose qui est responsable. On observe la complexation avec les homologues inférieurs et, comme il est plus facile d'arriver à des certitudes avec ces petites molécules, nous allons les traiter en priorité.

11.5.2 Complexes de l' α -cyclodextrine

En mettant au contact une solution aqueuse d' α -cyclodextrine et une solution éthérée d'iode, des cristaux brun rougeâtre se développent à l'interface. Ils répondent à la composition $(C_6H_{10}O_5)_6 \cdot I_2 \cdot 4H_2O$. L'analyse par diffraction de rayons X indique que la molécule d'iode est colinéaire à l'axe C_6 de la cyclodextrine. Les plus proches contacts dans la direction perpendiculaire à cet axe ont lieu entre l'un

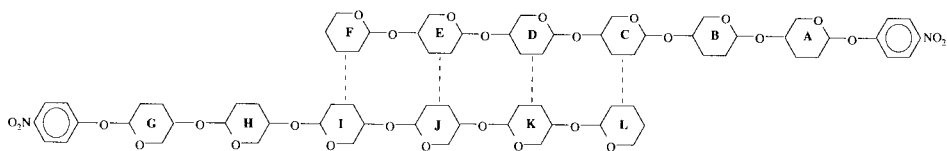
des atomes d'iode et les carbones C(5) et C(6), et l'autre atome d'iode et l'oxygène O(4). L'environnement est donc hydrophobe pour le premier, hydrophile pour le second. L'empilement des molécules dans le cristal est tel que les deux orifices de la cavité de chaque molécule de cyclodextrine sont bouchés par les molécules voisines. On a affaire ici à un complexe du type *cage*^[10].

Lorsqu'on prépare les complexes en présence d'iodure, on peut obtenir, suivant les conditions quatre types de complexes différents. On ne parlera ici que du complexe brun-noir, $(\alpha\text{-cyclodextrine})_2\text{Cd}_{0,5}\text{I}_5\cdot 27\text{H}_2\text{O}$. Sur l'axe C_6 de la molécule, on trouve quatre des cinq atomes d'iode de I_5^- , le cinquième, central, étant désordonné. Les deux molécules d' α -cyclodextrine se font face par leurs grandes bases, entre lesquelles se trouve l'atome d'iode désordonné, **11.18**. Les édifices **11.18** sont empilés les uns sur les autres de façon à créer un canal continu rempli d'atomes d'iode. On a ici un complexe de type *canal*^[11]. On observe soit l'un soit l'autre des deux types de structure cristalline rencontrées ici, *cage* ou *canal*, avec des molécules hôtes autres que l'iode.

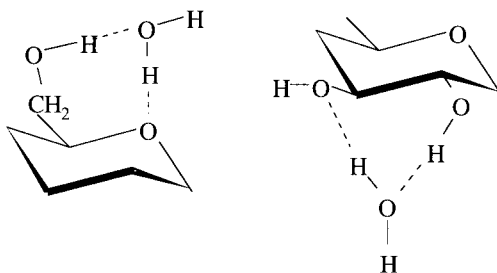
11.5.3 Le complexe (paranitrophényl α -maltohexaoside)₂ Ba (I₃)₂·27 H₂O

Le préfixe *malto* sert à désigner plus précisément une famille d'oligosaccharides de linéaires de formule générale **11.13** ($R = \text{H}$, $R' = \text{OH}$), avec n pair. Pour cette raison, on peut les voir comme des dérivés de l'anomère α du maltose, **11.13** ($R = \text{H}$, $R' = \text{OH}$, $n = 2$). On peut considérer le maltohexaose ($n = 6$) comme un petit fragment d'amylose. Dans cette étude^[12], on a utilisé l' α -glycoside du paranitrophénol, que nous désignerons par M, pour éviter les complications d'une possible mutarotation. L'évaporation de solutions aqueuses décimolaires en M et triiodure de baryum amène la cristallisation d'aiguilles brunâtres $\text{M}_2\cdot\text{Ba}(\text{I}_3)_2\cdot 27\text{H}_2\text{O}$. Ce complexe n'est donc pas bleu intense, il a la couleur de l'iode en solution aqueuse. Nous simplifierons à l'extrême la description de cette molécule, assez compliquée dans les détails, pour concentrer l'attention sur les points qui nous semblent les plus intéressants.

La maille élémentaire contient quatre anions I_3^- qui forment une ligne brisée allongée **11.19**. Les distances entre les triiodures sont un peu inférieures aux distances de Van der Waals. Chaque groupe de deux triiodures consécutifs est en contact avec deux hydroxyles du sucre et deux molécules d'eau. L'environnement n'est donc pas hydrophobe essentiellement et c'est peut-être la raison pour laquelle la couleur du complexe se rapproche de celle de l'iode dans l'eau ou l'alcool, plutôt que du bleu du complexe iode-amidon. Autour de chaque triiodure s'enroulent deux molécules M, chacune en hélice à gauche, mais en disposition relative antiparallèle. Elles sont représentées sur la formule **11.20** par une ligne en V terminée par un hexagone qui matérialise l'aglycone, tandis que la colonne d'iode est dessinée rectiligne. On observe une interaction d'empilement entre les noyaux aromatiques des aglycones de deux molécules M antiparallèles, qui renforce peut-être la cohésion du système. Les deux chaînes solidaires d'un anion



11.21



11.22

triiodure sont dessinées dépliées en **11.21**. Les traits pointillés représentent les liaisons hydrogènes directes entre ces chaînes. La cohésion du système est largement assurée par le cation Ba^{++} , qui présente la coordinence 10. Il est lié à quatre résidus α -D-glucopyranosyl, de *quatre chaînes M différentes*, deux fois sur les oxygènes 4 et 6 et deux fois sur les oxygènes 2 et 3, et à deux molécules d'eau. La double hélice antiparallèle est très hydratée. Tous les groupes donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène sont impliqués, y compris la plupart des oxygènes cycliques. On observe la prédominance remarquable de chélations impliquant O(5) et O(6), ainsi que O(2) et O(3), conduisant à des cycles à 5 éléments, **11.22**. La superposition des mailles élémentaires schématisées selon **11.20** donne dans le cristal une cavité cylindrique infinie, délimitée par les hélices M et remplie d'anions triiodure en zigzag.

11.5.4 Complexe iodé de l'amylose

La complexation en solution de l'iode par l'amylose se poursuit jusqu'à ce que le polysaccharide ait séquestré environ 20 % de son poids d'iode. Le taux exact, ainsi que la longueur d'onde au maximum d'absorption du colorant bleu, variant de 606 à 642 nm, dépendent des conditions expérimentales et de l'origine de l'amylose. On peut aussi obtenir le colorant en traitant l'amylose V par la vapeur d'iode. Il est généralement admis que l'iode s'installe au centre de l'hélice^[13]. Cela pourrait expliquer l'absence de réaction des amyloses A et B, en double hélice compacte, sans place suffisante disponible sur leur axe. On a fait une structure à l'état solide du complexe iodé de l'amylose V_h ^[14]. Le complexe avec le dimé-

thylsulfoxyde est décomposé par le méthanol bouillant, puis exposé à la vapeur d'iode en atmosphère saturée d'humidité. Il prend à ce moment-là la coloration bleu intense caractéristique. On peut décrire la structure ainsi : une droite ou une ligne presque rectiligne sur laquelle s'alignent des atomes d'iode, séparés par 295 ± 4 pm, pratiquement équidistants. Tout autour s'enroule l'amylose en une hélice à gauche dont chaque tour correspond à six unités α -D-glucopyranose. Il y a trois atomes d'iode par tour d'hélice. Les atomes d'iode sont alignés ; il n'y a pas de contact avec des atomes d'oxygène et la couleur est bleue, tandis que dans le complexe du paranitrophényl α -D-maltohexaoside avec I_3^- , la chaîne d'iode est zigzagante, il y a des contacts avec les atomes d'oxygène et la couleur est brune.

Selon un article récent, la complexation de l'amylose rigoureusement anhydre (ce qui évite la formation d'anion iodure) donnerait un complexe de l'iode moléculaire^[15].

11.6 INTERACTION DES SUCRES AVEC L'EAU LIQUIDE

11.6.1 Importance du problème

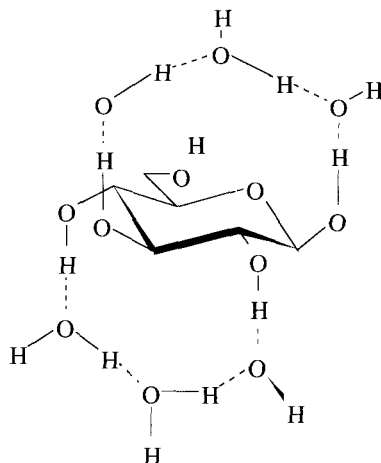
La place de cette question dans le chapitre ne doit pas faire juger qu'elle est secondaire. On l'a reportée à la fin à cause de l'incertitude qui plane sur les interprétations. Nous exposerons essentiellement des hypothèses et des tentatives de réponse expérimentale. Rappelons une banalité : le glucose et la majorité des sucres libres sont très solubles dans l'eau. Il reste une part de vérité dans le vieux nom d'hydrate de carbone, car c'est la famille organique la plus voisine de l'eau. Aussi, les molécules de sucres, attachées à la périphérie des cellules vivant en milieu aqueux assurent-elles une espèce de continuité entre une membrane hydrophobe dans ses parties profondes et le milieu aqueux extérieur. L'universalité du glucose dans le monde vivant suggère une origine très ancienne. Doit-il son émergence à une adaptation particulière à l'eau de « l'océan primordial » ? Ceci est pure spéculation, mais il y a aussi des problèmes de notre monde contemporain. Bon nombre d'interactions entre une cellule et son milieu reposent sur l'attachement d'un oligosaccharide membranaire qui baigne dans un milieu aqueux à un récepteur lipidique ou protéique. On peut en général mesurer les paramètres thermodynamiques de cette réaction mais leur interprétation concrète exige que l'on connaisse bien le type de liaison impliqué dans l'état initial. En forçant un peu les mots, on pourrait dire que l'eau liquide est le récepteur primordial et universel de tous les sucres et voir les interactions sucre-récepteur protéiques en milieu aqueux comme le passage d'un récepteur à un autre.

11.6.2 Le modèle d'hydratation stéréospécifique des hexopyranoses

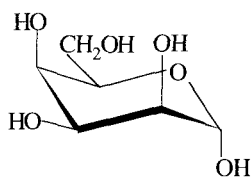
Elucider les détails de l'interaction entre le sucre et l'eau revient à séparer le comportement d'une mince pellicule au contact du soluté de celui de la masse des

molécules d'eau qui l'entourent. On observe les variations avec la concentration de certaines propriétés du solvant, concernant ses atomes d'oxygène, d'hydrogène, ou la molécule entière, et on les interprète comme un effet des perturbations qui affectent la fraction d'eau liée sur la moyenne générale. On observe des différences entre les divers hexoses, ce qui oblige d'emblée à écarter l'idée que chaque hydroxyle peut être à la fois donneur et accepteur de façon indifférenciée. En comparant l'effet sur l'eau d'une collection de sucres, on essaye de construire un *modèle d'hydratation spécifique*, c'est-à-dire d'énoncer les règles qui définissent la constitution des hydrates en fonction de la configuration et la conformation du sucre dissous. On voit tout de suite que l'exploitation des expériences sera difficile, puisque chaque sucre en solution aqueuse est un mélange, dans le pire des cas, des deux pyranoses et des deux furanoses. Une autre source de difficultés, apparemment négligée par les auteurs, est l'instabilité conformationnelle, qui entraîne un mélange de formes, même pour un tautomère déterminé (voir le chapitre 2). Bien sûr, les hexopyranoses sont rigides, à l'exception de l'idose, mais avec les pentopyranoses, il y a lieu d'examiner s'il n'y a pas de changement de conformation dans les conditions de l'expérience. Enfin, il y a le problème de la flexibilité des furanoses.

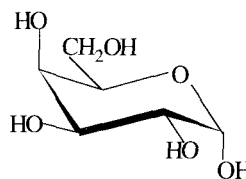
Autre source de difficulté, les écoles de pensée concernées par ces problèmes semblent avoir une conception différente de l'« adaptation ». Selon l'une de ces écoles, une perturbation élevée des propriétés de l'eau de la solution par rapport à celles de l'eau pure révèle qu'il y a un grand nombre de molécules d'eau associées au sucre, donc que cette couche d'hydratation est relativement stable. Les auteurs considèrent alors que c'est une indication de sa bonne intégration au réseau de l'eau. Ainsi, on calcule que β -D-glucopyranose entraînerait avec lui quatre molécules d'eau, formant un édifice dont la durée de vie, de l'ordre de la μ s, serait mille fois plus grande que celle des liaisons hydrogène dans le solvant. Cette hydratation optimale serait une conséquence de la configuration favorable de ses hydroxyles. La distance entre les couples équatoriaux O(1) - O(3) et O(2) - O(4) est très proche de la distance entre un atome d'oxygène et son *second* voisin dans l'eau pure. Ceci permettrait la formation de **11.23** qui se raccorde bien au réseau de l'eau. Quand on s'éloigne de cette configuration optimale, l'hydratation diminue. L' α -D-glucopyranose n'entraînerait plus que trois molécules d'eau. La prépondérance en solution aqueuse de l'anomère β du D-glucopyranose, contraire à l'effet anomérique, est interprétée comme une conséquence de sa meilleure stabilisation par le réseau de l'eau^[16]. Comme l'hydroxyle primaire est aussi impliqué dans le réseau de liaisons hydrogène, certains auteurs ont formulé l'énoncé paradoxal : tous les groupements polaires du β -D-glucose participent à des liaisons hydrogène ; en conséquence il se comporte comme un soluté hydrophobe, en ce sens qu'une molécule étrangère qui l'approche ne voit que des liaisons C-H. Pour conclure, on voit que selon ces principes, l'hydratation calculée étant fonction croissante de la perturbation, la meilleure adaptation au réseau de l'eau correspond à la perturbation maximale des propriétés de l'eau pure.



11.23



11.24



11.25

Une autre école défend le point de vue opposé^[17]. Si un sucre s'adaptait parfaitement au réseau de l'eau, les molécules d'eau à son contact ne se distingueraient en rien des autres : la perturbation des propriétés physiques de l'eau pure serait nulle. Dans la pratique, le sucre le mieux adapté est celui qui perturbe le moins ; c'est l' α -D-talose, **11.24**, et le plus mal adapté, celui qui perturbe le plus, est l' α -D-galactose **11.25**.

Sur le sucre **11.24**, les oxygènes O(2), O(4) et O(6) forment un triangle presque équilatéral, dont le côté est approximativement égal à la distance entre un oxygène et son *premier* voisin dans le réseau de l'eau. Il y aurait trois distances adaptables au réseau de l'eau, contre une seule pour l' α -D-galactopyranose.

11.6.3 Principe des mesures

Relaxation

On prendra l'exemple de la relaxation observée en RMN^[18]. Sous l'effet de l'agitation moléculaire, une magnétisation s'amortit suivant une loi (supposée)

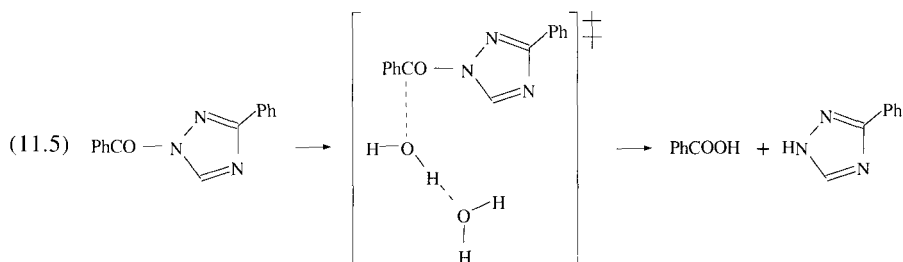
exponentielle $M = M_0 (1 - e^{-t/T_l})$; T_l , *temps de relaxation longitudinale*, est une mesure de mobilité. Dans la molécule d'eau pure, T_l mesuré avec l'isotope ^{17}O présent en abondance naturelle est de 7,3 ms à 25°C. Il est multiplié par environ 1,6 dans les solutions d'hexoses de molalité 2,0. On explique ceci en considérant que l'eau liée au moins temporairement au sucre comme couche de solvation est moins mobile que celle de la masse du solvant. La perturbation croît dans le sens mannose, galactose, glucose.

Mesure de compressibilité

Un procédé acoustique permet de mesurer les compressibilités isentropiques molaires partielles. Selon les auteurs, si un soluté s'adapte exactement à l'eau, on doit observer la même valeur que dans l'eau pure, $8,17 \times 10^{-4} \text{ mL mol}^{-1} \text{ bar}^{-1}$. Dans ce cas idéal, les molécules d'eau au contact sont indiscernables. S'il y a mauvaise adaptation, il y a une couche intermédiaire supposée moins compressible que l'eau pure. On trouve effectivement des compressibilités molaires partielles négatives : talose -11,9 ; mannose -16,0 ; glucose -17,6 ; galactose -20,8 $\times 10^{-4} \text{ mL mol}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ à 25°C.

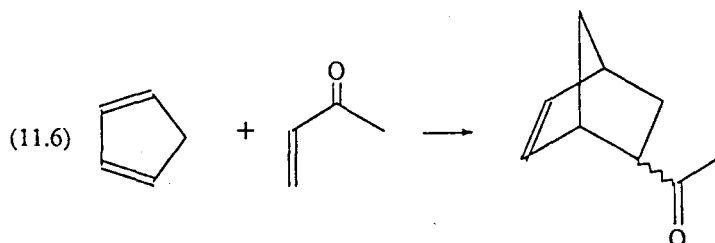
Effet cinétique du milieu

Il s'agit de l'influence d'un soluté étranger sur la vitesse d'une réaction en solution. La réaction (11.5) étudiée ici est la partie indépendante du pH de l'hydrolyse d'une benzamide dans l'eau. Elle procède par un état de transition polaire qui contient deux molécules d'eau. La réaction est retardée par tous les hexoses. On interprète en supposant qu'il y a des molécules d'eau communes dans les couches d'hydratation de la benzamide, de l'état de transition et du sucre, ce qui a pour effet de modifier d'une façon non parallèle les enthalpies libres du produit de départ et de l'état de transition. Si le sucre se comporte réellement de manière hydrophobe, on peut imaginer qu'il aura une interaction stabilisante avec la benzamide peu polaire. Le ralentissement augmente dans le sens galactose, glucose, mannose et talose. Les auteurs considèrent que cela traduit une augmentation de caractère hydrophobe et confirme les résultats de la mesure de compressibilité. Nous devons cependant souligner ici que le talose est le seul hexose de la série étudiée qui contienne 31 % de furanose en solution aqueuse.



Cycloaddition en phase aqueuse

La cycloaddition d'un diène sur un diénophile a la réputation d'être peu sensible à la polarité du solvant. Cependant, elle est considérablement accélérée dans l'eau^[19]. Ainsi la réaction (11.6) est 1000 fois plus rapide dans l'eau que dans l'isooctane. On a suggéré que ceci était une conséquence de l'effet hydrophobe. L'accélération est encore plus grande dans les solutions de LiCl, sel qui diminue la solubilité des molécules lipophiles dans l'eau par augmentation de l'effet hydrophobe. On a déjà signalé au paragraphe 11.3 un effet analogue de la β -cyclodextrine. Diène et diénophile peuvent être complexés simultanément dans la cavité hydrophobe de taille adéquate. L' α -cyclodextrine, plus petite, ne peut complexer que l'un des réactifs et ralentit la réaction. Quand la vitesse d'une réaction dépend à ce point de la nature du solvant, il est tentant de l'utiliser comme outil chimique d'étude de ce solvant : ses paramètres d'activation doivent être à priori très sensibles à l'addition de composés qui en modifient la structure. On les a comparés dans le méthanol et l'eau^[20]. Le tableau 11.1 (lignes 1 et 2) montre que l'accélération, lorsque l'on passe de la solution méthanolique à la solution aqueuse, vient d'une augmentation de l'entropie d'activation. Ceci pourrait être la conséquence d'une diminution d'entropie au transfert du méthanol à l'eau plus importante pour l'état initial que pour l'état final.

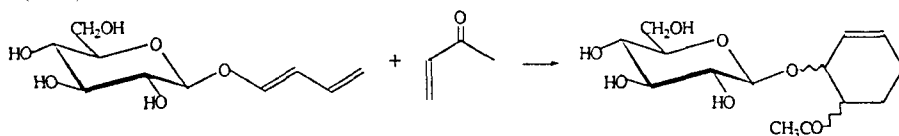


Réaction	Solvant	$10^4 k_2$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$\Delta H^\ddagger$ ($kJ mol^{-1}$)	$\Delta S^\ddagger$ ($J mol^{-1} T^{-1}$)	$\Delta(\Delta H^\ddagger)^*$ ($kJ mol^{-1}$)	$T\Delta(\Delta S)^\ddagger$ ($kJ mol^{-1}$)
(11.6)	eau	543	$38,0 \pm 1,7$	$-140,9 \pm 5,0$	0	9,83
(11.6)	méthanol	10,4	$38,0 \pm 1,0$	$-173,9 \pm 3,4$		
(11.7)	eau	2,85	$40,0 \pm 0,6$	$-178,8 \pm 2,1$	6,4	9,63
(11.7)	méthanol-eau (1:1, vol/vol)	0,85	$33,6 \pm 0,8$	$-211,1 \pm 2,6$		

Tableau 11.1 Grandeurs thermodynamiques d'activation dans la cycloaddition à 25°C (* : Augmentation du solvant méthanolique à l'eau). D'après A. Lubineau, H. Bienaymé, Y. Queneau et M. C. Scherrmann, *New J. Chem.*, 18 (1994) 279-285 (publié avec l'aimable autorisation de Gauthier-Villars ; © 1994 Gauthier-Villars).

La sonde chimique idéale de la structure du solvant devrait mettre en jeu des réactifs moins volatils et plus solubles dans l'eau, ce qui est apparemment incompatible avec un caractère lipophile. On s'en rapproche avec un diène lié à un sucre libre, selon la réaction (11.7). La comparaison des lignes 3 et 4 du tableau 11.1 montre que cette réaction est également accélérée dans l'eau pure et que c'est là aussi une conséquence de l'augmentation de l'entropie d'activation. Donc, l'effet hydrophobe peut s'exercer entre diène et diénophile à proximité de la partie sucre.

(11.7)



La réaction (11.7) est très sensible à l'addition de sucres au milieu réactionnel. Le tableau 11.2 donne des précisions numériques. Ces sucres, sans action à faible concentration, accélèrent la réaction d'une façon linéaire à partir de 0,2 M. A la concentration 2M, le glucose accélère plus la réaction qu'une solution saturée de β -cyclodextrine. Les additions de glucose, mannose, galactose, sorbitol, ribose... ont des effets accélérateurs comparables, mais ceci occulte peut-être des mécanismes bien différents. Ainsi à titre d'exemples, si le glucose et le ribose à la même molalité (2,6 M) accélèrent tous deux la réaction, le ribose accélère la réaction grâce à une baisse de l'enthalpie d'activation alors que le glucose se comporte comme le chlorure de lithium et accélère la réaction en agissant favorablement à la fois sur les termes entropique et enthalpique contrairement à la règle habituelle de compensation. Il a naturellement été montré que cette accélération n'est pas une conséquence de l'augmentation de viscosité du milieu, qui se révèle au contraire être un facteur défavorable.

Cette étude montre donc le caractère structurant du glucose (il augmente l'effet hydrophobe) par rapport au ribose et apporte un support nouveau au modèle d'hydratation spécifique des sucres. Se liant de manière privilégiée au réseau tétracoordonné de l'eau liquide, le glucose maintient cette structure par liaison

Additif	Aucun	Méthanol	Glucose			Saccharose		β -Cyclodextrine
Molarité	—	(50 %)	1 M	2 M	3 M	1 M	2 M	(saturée)
$10^5 k_2$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	28,5	8,5	34,0	45,0	61,3	44,9	74,9	40,2

Tableau 11.2 Influence d'additifs sur la constante de vitesse du second ordre de la réaction (11.7) à 25°C dans l'eau. D'après A. Lubineau, H. Bienaimé, Y. Queneau et M.C. Scherrmann, *New. J. Chem.*, 18 (1994) (publié avec l'aimable autorisation de Gauthier-Villars ; © 1994 Gauthier-Villars).

hydrogène coopérative et favorise les interactions entre les molécules lipophiles limitant ainsi les contacts défavorables avec l'eau structurée. Cela pourrait expliquer le comportement favorable du glucose (par rapport au ribose) dans la stabilisation de protéines comme l'ovalbumine contre la dénaturation thermique.

RÉFÉRENCES

- [1] S. J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 47 (1989) 1-43.
- [2] F. Francks, *Water*, The Royal Society of Chemistry, Londres, 1984.
- [3] R. J. Clarke, J. H. Coates et S. F. Lincoln, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46 (1988) 205-249.
- [4] R. J. Bergeron, M. A. Channing, G. J. Gibeily et D. M. Pillor, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 5146.
- [5] Y. Yamamoto, M. Onda, M. Kitagawa, Y. Inoue et R. Chûjô, *Carbohydr. Res.*, 167 (1987) C11-C16.
- [6] P. V. Demarco et A. L. Thakkar, *Chem. Commun.*, (1970) 2-4.
- [7] J. F. Kennedy et C. A. White, « The Plant, Algal and Microbial Polysaccharides » dans *Carbohydrate Chemistry* publié sous la direction de J. F. Kennedy, Clarendon Press Oxford, 1988, Chapitre 6, p. 220-262.
- [8] H. C. H. Wu et A. Sarko, *Carbohydr. Res.*, 61 (1978) 7-25 et 27-40.
- [9] G. Rappenecker et P. Zugenmaier, *Carbohydr. Res.*, 89 (1981) 11-19.
- [10] R. K. McMullan, W. Sängner, J. Fayos et D. Mootz, *Carbohydr. Res.*, 31 (1973) 211-227.
- [11] M. Noltemeyer et W. Sängner, *J. Am., Chem. Soc.*, 102 (1980) 2710-2722.
- [12] W. Hinrichs et W. Sängner, *J. Am., Chem. Soc.*, 112 (1990) 2789-2796.
- [13] R. E. Rundle, *J. Am., Chem. Soc.*, 69 (1947) 1760-1772.
- [14] T. L. Blum et P. Zugenmaier, *Carbohydr. Res.*, 89 (1981) 1-10.
- [15] K. A. Murdoch, *Carbohydr. Res.*, 233 (1992) 161-174.
- [16] F. Franck, *Pure Appl. Chem.*, 59 (1987) 1189-1202.
- [17] S. A. Galena, M. J. Blandamer et J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.*, 57 (1992) 1995-2001.
- [18] H. Uedaira, M. Ikura et H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62 (1989) 1-4.
- [19] D. C. Rideout et R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7816-7817.
- [20] A. Lubineau, H. Bienaymé, Y. Queneau et M.C. Scherrmann, *New J. Chem.*, 18 (1994) 279-285.

Acides sialiques et oligosaccharides sialylés

12.1 ÉTAT NATUREL

Les acides sialiques naturels^[1] sont des dérivés de l'acide 5-amino-3,5-didéoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-nonulosonique **12.1**. On remplace ce nom encombrant par « acide neuraminique ». Le plus commun est l'acide *N*-acétylneuraminique **12.2**, dont la configuration est facile à mémoriser, car, en représentation Fischer, **12.3**, il se présente comme un produit de condensation aldolique de la *N*-acétylmannosamine (2-acétamido-2-déoxy-D-mannose) et de l'acide pyruvique. C'est du dérivé **12.2** qu'il s'agit lorsqu'on emploie les mots « acide sialique » sans autre précision. Il existe à l'état libre ou glycosidé dans la conformation $L - {}^2C_5$, qui permet une disposition équatoriale de la chaîne latérale à trois carbones. Le dessin **12.2** est celui de l'anomère stable β du sucre libre, qui associe un hydroxyle anomérique axial à des substituants non anomériques tous équatoriaux. Le spectre de rayons X de cet anomère β cristallisé confirme cette conformation et nous apprend en plus que la chaîne latérale a la conformation zigzag plan, avec les deux hydroxyles en 7 et 8 en disposition *trans*. Cette conformation $L - {}^2C_5$ est également indiquée en solution aqueuse par le spectre de RMN du proton, qui dépend un peu du pH puisqu'il y a une fonction dissociable. En solution aqueuse, au pH 7.0, les signaux de certains protons des anomères α et β sont bien séparés (Tableau 12.1) et le rapport des concentrations $\beta : \alpha$ est de 93 : 7. Les glycosides naturels de l'acide sialique ont tous la configuration anomérique α , tandis que la forme d'activation naturelle (voir le paragraphe 12.4) a la configuration β .

Anomère	H - 3ax	H - 3 eq	NAc
β	1,827	2,208	2,050
α	1,621	2,730	2,030

Tableau 12.1 Signaux RMN de certains protons de Neu5Ac en solution aqueuse (pH 7,0). D'après J. Haverkamp, H. Van Halbeek, L. Dorland, J.F.G. Vliegthart, R. Pfeil et R. Schauer, *Eur. J. Biochem.*, 122 (1982) 305-311.

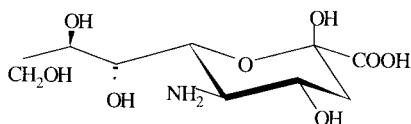
Neu 5 Ac (12.2)	Neu 5 Gc
Neu 4,5 Ac ₂	Neu 4 Ac 5 Gc
Neu 5,8 Ac ₂	Neu 7 Ac 5 Gc
Neu 5,9 Ac ₂	Neu 9 Ac 5 Gc
Neu 4, 5, 9 Ac ₃	Neu 7,9 Ac ₂ 5 Gc
Neu 5, 7, 9 Ac ₃	Neu 8,9 Ac ₂ 5 Gc
Neu 5, 8, 9 Ac ₃	Neu 7, 8, 9 Ac ₃ 5 Gc
Neu 5, 7, 8, 9 Ac ₄	Neu 5 Gc 8 Me
Neu 5 Ac 9 Lac	Neu 9 Ac 5 Gc 8 Me
Neu 4, 5 Ac ₂ 9 Lac	Neu 5 Gc 8S
Neu 5 Ac 8 Me	Neu 5 (COCH ₂ OAc)
Neu 5,9 Ac ₂ 8 Me	
Neu 5 Ac 9 P	Neu 2 en 5 Ac (12.4)

Tableau 12.2 Dérivés naturels de l'acide neuraminique.

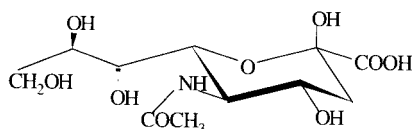
On rencontre deux types de dérivés sialiques dans le monde vivant : des résidus α -sialopyranosides, situés dans l'immense majorité des cas en position terminale non réductrice de chaînes oligosaccharidiques, et des produits polycondensés « polysialosides ». On traitera ceux-ci plus spécialement en fin de chapitre. Dans les oligosaccharides sialylés solidaires des surfaces cellulaires, la position périphérique de l'acide sialique entraîne sa participation à de nombreux phénomènes de reconnaissance : attachement d'enzymes, hormones, toxines, lectines, bactéries et virus, participation au développement du système nerveux. C'est le principal responsable de la charge négative des cellules.

Une particularité de la configuration neuraminique, c'est qu'on en a rencontré à ce jour au moins vingt-cinq dérivés de substitution différents dans les glycoconjugués (Tableau 12.2). Sur la structure de base, on trouve les substituants acétyl (Ac), glycollyl (Gc), lactyl (Lac), acétoxyacétyl, méthyl (Me), sulfate (S) et phosphate (P). Leur symbole abrégé utilise les trois lettres Neu, qui représentent l'acide neuraminique, **12.1**, suivie, d'un chiffre qui indique la place du substituant, sur l'oxygène ou l'azote, et du symbole du substituant. Par exemple, l'acide 9-*O*-acétyl-*N*-glycollylneuraminique s'écrit Neu9Ac5Gc. Le dernier acide en bas à gauche du tableau 12.2, Neu2en5Ac, est un produit d'élimination de l'hydroxyle anomérique, **12.4**. On en rencontre des traces dans les fluides humains, et, sous forme dérivée, c'est un sous-produit non désiré dans certaines réactions chimiques. Cette diversité d'expression est particulière à la configuration neuraminique : les autres configurations reconnues dans les glycoconjugués se manifestant d'une façon uniforme.

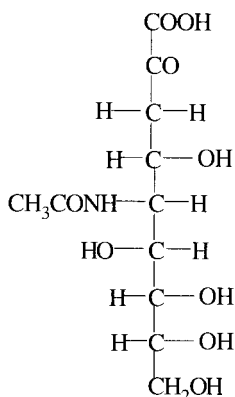
Les acides sialiques se distinguent également des autres monosaccharides des glycoconjugués par leur absence totale du règne végétal. Ce sont des productions typiques du règne animal, quoiqu'on en trouve dans quelques bactéries d'ailleurs pathogènes pour l'homme et un protozoaire. Ils apparaissent à partir des échinodermes, étoiles de mer et oursins, où l'on trouve les éthers méthyliques



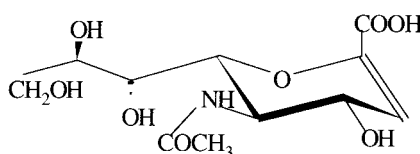
12.1



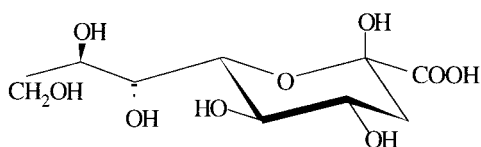
12.2



12.3



12.4



12.5

Neu5Ac8Me et le sulfate Neu5Gc8S de la fonction alcool en C(8). Parmi les vertébrés, c'est chez les mammifères que l'on observe la plus grande variété et il y a des différences nettes entre les dérivés que l'on trouve chez l'homme et, par exemple, le bétail. La concentration dans la salive humaine normale est 25 μM . On a décrit le cas d'un enfant retardé mentalement qui en sécrétait 10 g par jour dans l'urine, soit 10^4 fois la normale. Les glycoprotéines des sécrétions normales sont souvent riches en acide sialiques : la mucine des glandes sous-maxillaires, les nids d'hirondelles de l'Extrême-Orient en contiennent 9 - 36 %, la gelée qui enveloppe les oursins jusqu'à 70 %.

L'acide sialique est instable en milieu acide (voir le paragraphe 10.4.1), donc le protocole de séparation par hydrolyse acide doit être un compromis entre une séparation insuffisante et une dégradation excessive. Nous avons déjà donné, au paragraphe 3.5.1, les conditions d'hydrolyse pour NeuAc et les conditions, encore plus modérées, qui permettent de séparer sans désacétylation totale ses esters acétiques. Il existe une grande variété d'enzymes, les neuraminidases, qui hydrolysent la liaison glycosidique des sialosides. On trouve sur les catalogues des préparations d'origine bactérienne, qu'il est commode d'utiliser après immobilisation sur agarose. Leur action nécessite un milieu légèrement acide, éventuellement des ions minéraux (par exemple Ca^{++} , 4 mM) et la vitesse d'hy-

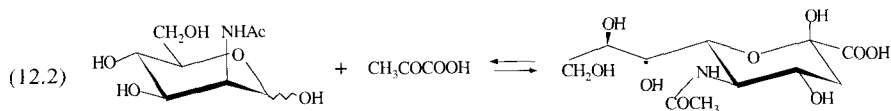
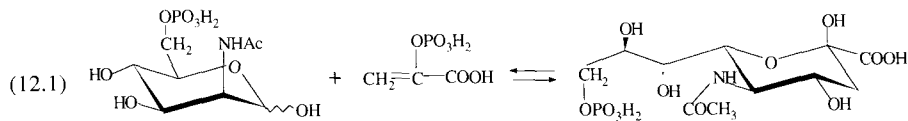
drolyse dépend des substituants sur l'acide neuraminique et de la position de la liaison sur le résidu pénultième. A la limite, l'activité peut être pratiquement nulle. Le produit primaire de l'action de la neuraminidase de *Clostridium perfringens* sur un α -sialoside est l'anomère α , qui s'isomérise ensuite lentement en β .

Pour terminer, il faut mentionner un sucre étroitement lié à l'acide sialique, dans sa structure et sa filiation biologique, l'acide 3-désoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonique **12.5**, ou KDN. Cet acide a été isolé à l'échelle du μg d'une polysialoglycoprotéine des œufs de la truite arc-en-ciel. Il est localisé exclusivement à l'extrémité non réductrice des chaînes polysialiques et jouerait un rôle dans l'activation des œufs des salmonidés en les protégeant contre la sialidase. Il se présente comme un acide sialique hydrolytiquement désaminé.

12.2 PRÉPARATIONS DES ACIDES SIALIQUES

On trouve en France dans les épiceries chinoises des préparations conditionnées pour la confection des potages de nids d'hirondelle. Elles contiennent 10 % de leur poids d'acide sialique combiné, que l'on peut récupérer par hydrolyse avec de l'acide sulfurique dilué et chaud, suivie d'une séparation sur une colonne d'échangeur d'anions. Le procédé est simple, mais la matière première est relativement coûteuse. Comme il y a en ce moment dans le monde une forte demande en acides sialiques pour les recherches en biologie humaine, on a proposé des procédés de caractère enzymatique qui ne reposent plus sur un approvisionnement lointain^[2].

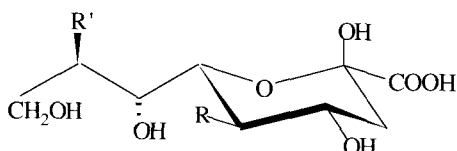
Les mammifères fabriquent leur acide sialique par condensation aldolique du phospho-enolpyruvate et du phosphate en 6 de la *N*-acétylmannosamine (Réaction (12.1)). Une enzyme *kinase* catalyse la phosphorylation de la *N*-acétylmannosamine et une phosphatase catalyse la déphosphatation de l'acide sialique. Ces étapes de phosphorylation et déphosphorylation sont irréversibles, si bien que la synthèse peut être totale même avec de faibles concentrations de substrat. Une variante de la réaction (12.1), observée chez la bactérie *Neisseria meningitidis* utilise la *N*-acétylmannosamine non phosphatée. Cependant ce ne sont pas ces enzymes que l'on a utilisées en synthèse préparative, mais une aldolase microbienne qui catalyse l'équilibre (12.2). Cette enzyme a probablement un rôle cata-



bolique dans ces organismes, mais elle fonctionne dans le sens synthétique en présence d'un excès de pyruvate. Elle est commercialement accessible à un prix acceptable et son clonage a été breveté. L'enzyme immobilisée sur agarose conserve encore 80 % de son activité après quatre utilisations consécutives et permet la synthèse de l'acide *N*-acétylneuraminique à l'échelle de la vingtaine de grammes. En raison du prix élevé de la *N*-acétylmannosamine pure, on utilise comme produit de départ le mélange de *N*-acétylmannosamine et *N*-acétylglucosamine obtenu par épimérisation alcaline de ce dernier sucre (dont le prix est négligeable). L'épimère *D*-gluco n'étant rigoureusement pas substrat, l'enzyme n'utilise que la *N*-acétylmannosamine^[3]. L'aldolase immobilisée a également permis de préparer en quantité appréciable un certain nombre des acides sialiques du tableau 12.2. Le produit de départ est un dérivé 2-azido-2-déoxy- β -*D*-manno qui permet, en jouant sur les groupements protecteurs d'obtenir des mannosamines diversement substituées en 2, 4 et 6. Ainsi ont été préparés les acides *N*-acétylés Neu5,9Ac₂ et Neu5Ac9Lac, les acides *N*-glycollylés Neu5Gc et Neu9Ac5Gc et un acétate de Neu5Gc, Neu5(COCH₂OAc)^[4]. Ces acides sont très répandus chez les animaux, mais non séparables à partir des sources naturelles en quantité suffisante pour une étude complète. L'aldolase accepte donc d'autres substrats que Man Ac, un point sur lequel nous reviendrons ci-dessous. Une autre adaptation de la synthèse enzymatique de l'acide sialique utilise la *N*-acétylglucosamine comme substrat et un système de deux enzymes, qui associe à la sialyl aldolase une *épimérase*. Celle-ci met en équilibre la *N*-acétylglucosamine et son épimère *manno* dans le réacteur, à un pH (7,0 - 8,0) compatible avec le fonctionnement de l'aldolase. Ces deux enzymes ne sont pas immobilisées, mais en solution aqueuse et sont retenues dans le réacteur par une membrane semi-perméable, qui laisse passer substrats et produit^[5]. Une installation de ce type a permis la préparation de 3,5 kg d'acide sialique.

Nous allons maintenant revoir le problème de la spécificité de l'enzyme. Il est instructif de revenir sur le KDN, **12.5**. La sialyl aldolase le met en équilibre avec ses deux produits de rupture aldolique, le *D*-mannose et le pyruvate. La conversion peut être orientée dans le sens synthétique et on peut préparer très efficacement le KDN avec cette enzyme, à partir de ces deux produits très communs, à n'importe quelle échelle^[6]. En fait le *D*-mannose est au moins aussi bon substrat que ManAc. Ceci suggère que la nature du substituant en 2 est peu importante, pourvu qu'il soit axial^[7] ^[8]. Effectivement, ce principe a permis de préparer des acides nonulosoniques avec des substituants variés en 5, tels les acides 5-déoxy, **12.6**, 5-azido, **12.7**, et 5-phényl, **12.8**. Les « mannosés désoxygénés » en 2, 4, 5 ou 6 donnent avec un bon rendement les acides nonulosoniques 5-, 7-, 8-, ou 9-déoxy. Le sucre obtenu en supprimant la chaîne latérale du *D*-mannopyranose, c'est-à-dire le *D*-lyxopyranose, donne l'acide octulosonique **12.11**. Son produit de désoxygénation sur C(2), le 2-déoxy-*D*-thréo-pentose est le substrat le plus simple connu à ce jour : il donne l'acide **12.12** d'une façon préparative.

Parmi les non-substrats nous avons noté GlcNAc, mais, fait remarquable, l'acide sialique des étoiles de mer Neu5Gc8Me, **12.9**, résiste à l'aldolase. Le produit



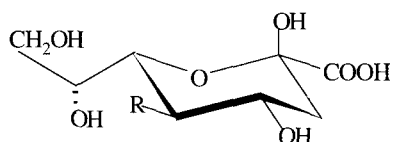
12.6 R= H, R'= OH

12.7 R= N₃, R'= OH

12.8 R= Ph, R'= OH

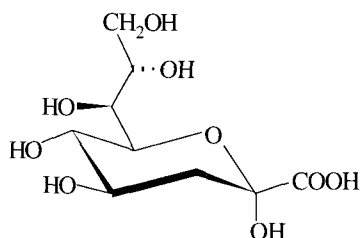
12.9 R= NHCOCH₂OH, R'= OMe

12.10 R= NHAc, R'= H

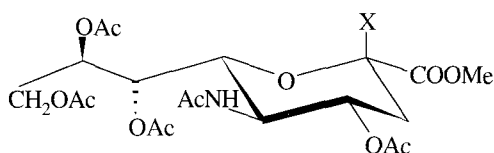


12.11 R= OH

12.12 R= H



12.13



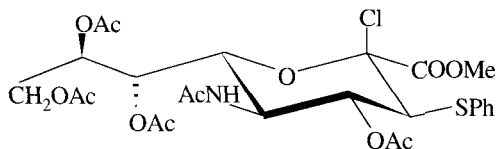
12.14

de rupture serait un furanose et, d'ailleurs, le furanose 2-acétamido-2-déoxy-5-*O*-méthyl-D-mannose n'est pas substrat. Cependant ni la présence d'un hydroxyle libre en 8 dans l'acide sialique, ni une configuration pyranose de l'hexose de rupture ne sont nécessaires, car l'acide 8-déoxy **12.10** est substrat^[9].

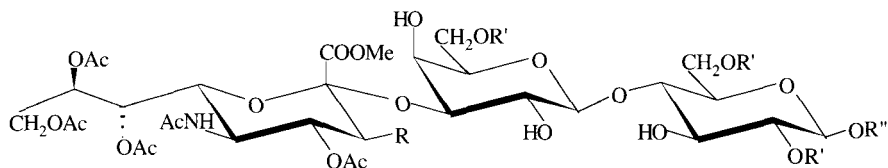
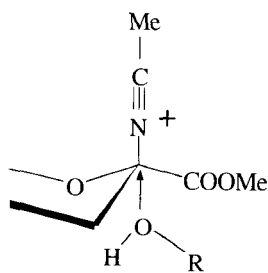
Par contre, on observe des réactions univoques et à bon rendement avec des sucres de la série L, comme le L-mannose, qui donne l'acide nonulosonique **12.13**^[10] et le L-gulose^[11]. L'acide **12.13** est énantiomère du KDN. Cette multiplicité d'observations montre qu'il est prématuré de définir la spécificité de l'enzyme, mais que d'ores et déjà, elle apparaît comme un remarquable outil de synthèse organique.

12.3 COUPLAGE CHIMIQUE

Le couplage chimique de l'acide sialique, la « sialylation » d'un sucre présente des difficultés particulières^[12]. Comme c'est un cétose, le couplage est la construction d'un carbone quaternaire. Il n'y a pas de substituant sur C(3), donc pas de participation à attendre de ce côté-là. Enfin les conditions des réactions de couplage favorisent la déshydratation qui donne une version protégée de l'acide **12.4**, particulièrement lorsque l'hydroxyle à coupler est peu nucléophile. Pour cette raison, les halogénoses peracétylés de style classique **12.14** (X = F, Cl, Br) donnent des résultats rarement satisfaisants avec les sucres protégés et, le plus



12.15

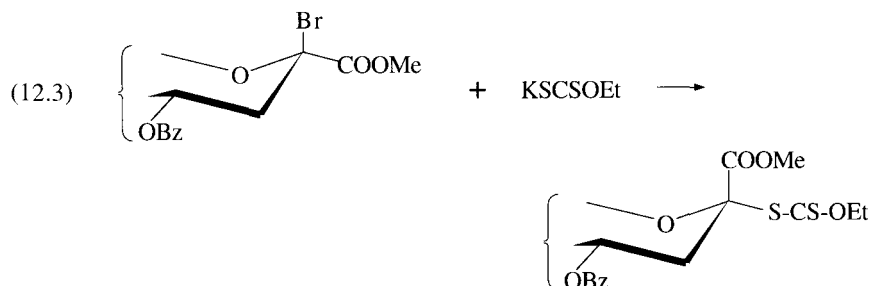
12.16 R= SPh, R'= COCMe₃, R''= CH₂CH₂SiMe₃12.17 R= H, R'= COCMe₃, R''= CH₂CH₂SiMe₃12.18 R= H, R'= Bz, R''= CH₂CH₂Br

12.19

souvent, des mélanges anomériques, en rendement global moins que moyen. On a proposé comme solution l'introduction d'un substituant équatorial temporaire sur C(3). Il peut fonctionner soit par participation, soit par blocage stérique de la face β . C'est dans cet esprit qu'on a préparé d'abord comme réactif sialylant un bromure analogue à **12.15**, mais avec protection des fonctions alcool par des benzyloxy. Ce réactif a permis^[12] la sialylation d'alcools secondaires avec de bons rendements. La voie d'accès la plus simple à un réactif de ce genre semble être l'addition du chlorure de phénylsulfényle, PhSCl, sur le peracétate de l'ester méthylique de l'acide oléfinique **12.4**, qui donne le réactif **12.15**. Celui-ci se condense sur la position 3' d'un lactoside partiellement protégé pour donner **12.16** avec 70 % de rendement. On obtient **12.17** par désulfuration avec le tributylstannane^{[13] [14] [15]}.

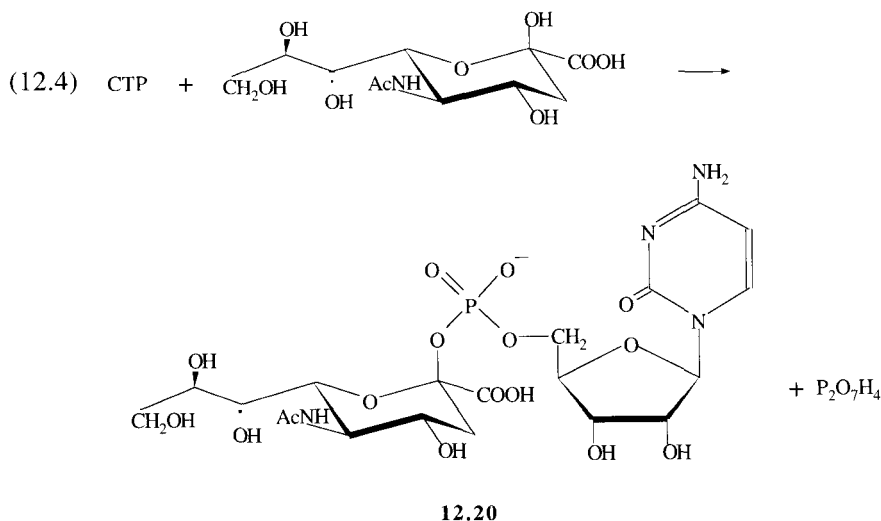
En fait, on a montré récemment que l'activation directe de thioglycosides de l'acide sialique donnait des rendements satisfaisants avec les hydroxyles secondaires. Ainsi le mélange anomérique des méthyl thioglycosides protégés de l'aci-

de sialique, en présence du promoteur *N*-iodosuccinimide – $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ se condense sur O(3) du galactose (α : 59 % ; β : 10 %)^[16]. On a enfin proposé le méthyl xanthate^[17], préparé suivant la réaction (12.3). Ce réactif sialylant est activé par additions successives de triflate d'argent et de MeSBr, précurseurs du promoteur $\text{CF}_3\text{SO}_3 - \text{SMe}$. Avec 2 équivalents de xanthate et un lactoside libre sur les positions 2', 3' et 4', on obtient **12.18** avec un rendement élevé (β : 1 %)^[18]. Dans ces couplages^{[16], [18]} le solvant contient toujours une proportion élevée d'acétonitrile (pur si possible) et on pense que la formation intermédiaire d'un nitrilium axial **12.19** favorise l'introduction α de l'oxygène.

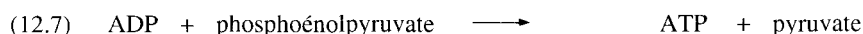
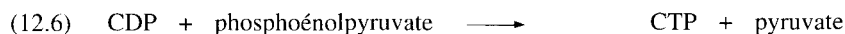
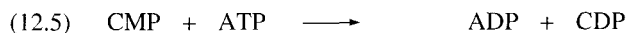


12.4 COUPLAGE ENZYMATIQUE

La forme activée naturelle de l'acide sialique est le « nucléotide-sucre » CMP-Neu5Ac **12.20** que les cellules fabriquent à partir de cytidine-triphosphate CTP en présence d'une *synthétase* (cytidine 5'-monophosphosialic acid synthétase) selon la réaction (12.4). Parmi les réactions d'activation de sucres, celle-ci est remarquable à plusieurs points de vue : l'enzyme a comme substrat le sucre non phos-



phorylé ; le nucléotide sucre est un phosphodiester au lieu d'un pyrophosphate (voir le paragraphe 10.4), la réaction est irréversible et la liaison est β . L'enzyme synthétase est isolable à partir de cervelle de veau achetée dans une boucherie^[2]. L'enzyme de *E. coli* a été clonée et surexprimée dans une souche de *E. coli*, dont elle représente 10 % des protéines solubles^{[19] [20]}. Elle admet comme substrat les acides neuraminiques modifiés, Neu5Gc et Neu5,9Ac₂ et, avec une efficacité moindre, KDN. La réaction (12.4) consomme une quantité stoechiométrique de CTP, produit rare et couteux. On part donc du nucléotide phosphate commun cytidine monophosphate, qui est phosphorylé deux fois, selon les réactions (12.5) et (12.6). La première phosphorylation, avec ATP, est catalysée par l'enzyme nucléoside monophosphate kinase. En raison du prix de ATP, il faut la coupler avec une réaction de régénération de ATP qui est la réaction traditionnelle de la biochimie, (12.7), catalysée par l'enzyme pyruvate kinase. La phosphorylation de CDP en CTP est possible directement par le phosphoenolpyruvate et la pyruvate kinase. En plus des deux kinases et de la synthétase, on utilise une pyrophosphatase inorganique pour hydrolyser le pyrophosphate formé dans la réaction (12.4) et la rendre irréversible. On immobilise séparément les quatre enzymes sur agarose et on mélange les gels, en suspension dans une solution aqueuse au pH 7,5 dans le réacteur. Ce système, alimenté en cytidine monophosphate, acide sialique et phosphoenolpyruvate et en présence de quantités catalytiques d'ATP, fabrique le nucléotide sucre que l'on peut extraire du milieu, après séparation des gels par filtration. La figure 12.1 schématise les réactions enzymatiques couplées dans le réacteur. On observe les rendements suivants^[2] : CMP-Neu5Ac : 60 % ; CMP-Neu5Gc : 80 % ; CMP - Neu5,9Ac₂ : 52 % ; CMP-KDN : 26 %.



L'étape suivante est le couplage sur le sucre accepteur, qui a lieu avec libération de CMP, catalysée par une *sialyltransferase*, présentée selon le mode de la biochimie sur la figure 12.2. Les sialyltransférases introduisent une unité sialyl sous la forme α -D-pyranosyl sur un sucre en situation terminale non réductrice dans un oligosaccharide. Les exemples que nous donnerons ci-dessous mettront en évidence la nature de leur spécificité.

La plus commune introduit le résidu α -D-sialopyranosyl sur la position primaire du galactose dans le méthyl β -D-galactopyranoside, le méthyl β -lactoside et la *N*-acétyl-lactosamine libre ou en position terminale non réductrice dans un oligosaccharide. Elle est abondante dans le foie de porc, disponible en boucherie. Sous forme immobilisée, elle a permis de préparer le tétrasaccharide glycoside **12.21a**, dont l'enchaînement est fréquent dans les glycoprotéines^[21]. Les trois couplages osidiques de **12.21a** ont été réalisés de trois façons différentes, le pre-

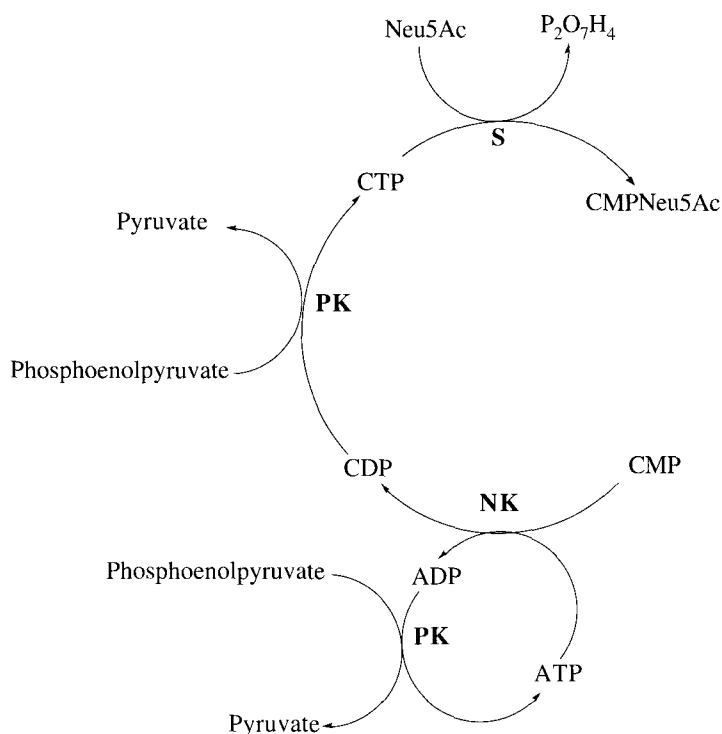


Figure 12.1 Synthèse enzymatique de CMPNeu5Ac avec régénération des cofacteurs : **NK** : nucléotide monophosphate kinase ; **PK** : pyruvate kinase ; **S** : synthétase.

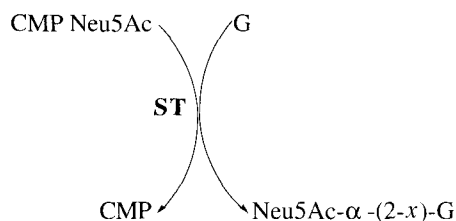
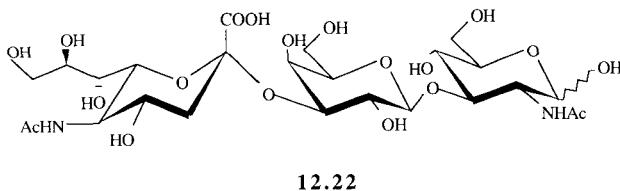
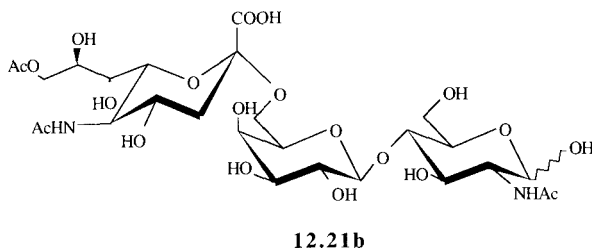
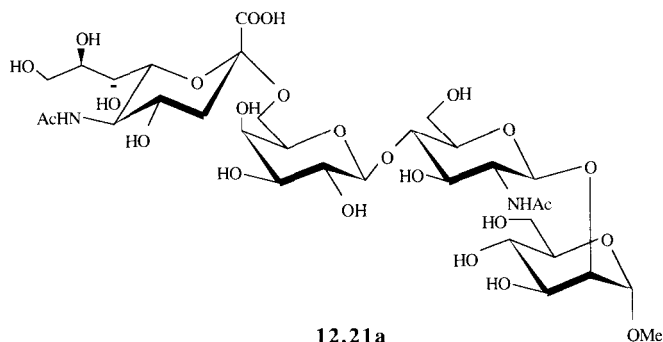


Figure 12.2 Sialylation enzymatique avec la sialyltransférase **ST**.

mier, sur le mannose, par un procédé de chimie organique (avec $AgCF_3SO_3$), le second avec la galactosyltransférase, le troisième avec la sialyltransférase (46 %). Cette enzyme admet également comme substrat le nucléotide CMP-Neu5,9Ac₂. Le transfert sur la lactosamine donne le trisaccharide **12.21b** (115 mg ; 57 %), qui fait partie du récepteur du virus de la grippe B sur les globules rouges^[21]. Il aurait été très compliqué de préparer par les voies chimiques traditionnelles un trisaccharide acétylé spécifiquement sur un seul de ses onze hydroxyles.



Toutefois, il semble que la majorité des oligosaccharides sialylés impliqués dans les phénomènes de reconnaissance présentent la liaison glycosidique Neu5Ac- α -(2-3)-Gal. On peut isoler du foie de porc sans difficultés excessives une transférase utilisable pour ce couplage, dont le substrat naturel est l'enchaînement β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GalNAc. Cette transférase catalyse aussi le couplage sur le motif β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc et a permis de préparer 140 mg du trisaccharide **12.22**, l'épitope « CA 50 » d'un antigène exprimé abondamment en association avec certaines tumeurs^[22].

On observera que l'association des schémas réactionnels des figures 12.1 et 12.2 forme un cycle de sialylation complet, qui en principe doit fonctionner avec seulement des quantités catalytiques de CMP. Toutefois une activité enzymatique parasite de la synthétase isolée de la cervelle de veau, impossible à éliminer économiquement, empêche le fonctionnement de ce cycle, qui a été réalisé avec la synthétase obtenue par clonage. Les deux transférases, α - (2 $\rightarrow$ 6) et α - (2 $\rightarrow$ 3) ont également été obtenues par clonage^[23] ^[24].

12.5 ACIDES POLYSIALIQUES^[25]

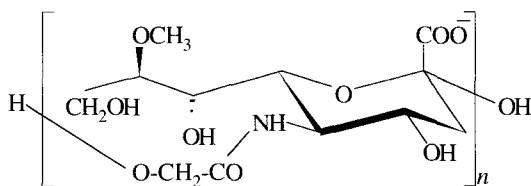
12.5.1 Introduction

Ce paragraphe suppose connues quelques notions sur les glycoprotéines et l'immunochimie qui ne seront développées que dans la suite de l'ouvrage, aux chapitres 13 et 15. Le lecteur pourra s'y reporter. Nous préférons cette présentation à un ordre plus logique et condenser en un seul chapitre le plus grand nombre de manifestations de la personnalité remarquable des acides sialiques.

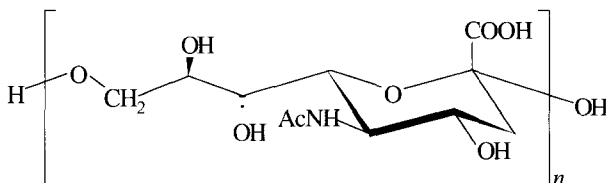
Les configurations de la liaison glycosidique dans les polymères polycondensés naturels de l'acide sialique sont $\alpha - (2 \rightarrow 8)$, $\alpha - (2 \rightarrow 9)$. Exceptionnellement, dans l'acide polysialique d'une étoile de mer, la liaison interglycosidique fait intervenir la fonction alcool primaire du résidu glycolyl dans Neu5Gc8Me^[25]. Des oligomères **12.23** ($n = 2, \dots, 5$) ont été isolés et caractérisés à partir d'un ganglioside présent dans une étoile de mer.

12.5.2 Acides polysialiques microbiens

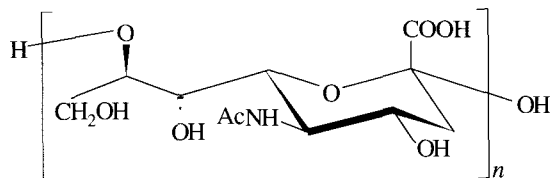
Les méningocoques, *Neisseria meningitidis*, se répartissent en dix sérogroupes distincts. Les groupes B et C sont responsables de 80 % des méningites observées, qui sont une cause majeure de mortalité chez les enfants et chez les adultes. Les capsules de ces bactéries contiennent des acides polysialiques linéaires. Dans le groupe C, la liaison entre les résidus sialiques qui peuvent être acétylés partiellement ou non acétylés est $\alpha - (2 \rightarrow 9)$. Cette structure **12.24** est un immunogène puissant ; le polysaccharide du groupe C est un vaccin autorisé. Cependant, il n'y a pas de réponse chez les enfants de moins de deux ans, peut être parce qu'à cet âge, ils expriment une structure polysialique analogue dans leurs tissus.



12.23



12.24



12.25

Les bactéries du groupe B présentent sur leur surface l'acide polysialique $\alpha - (2 \rightarrow 8)$ **12.25**. Il est très peu immunogène et il n'y a pas de vaccin connu contre cette forme de la maladie. On attribue ceci à la présence d'un acide polysialique très voisin dans le cerveau humain, si bien que cette structure n'est pas reconnue comme étrangère par le système immunitaire (voir le paragraphe 12.5.3). De fait on connaît un anticorps monoclonal commun à ces deux acides polysialiques (réaction croisée). La bactérie *Escherichia coli* KI, également cause de méningite, produit aussi un acide polysialique $\alpha - (2 \rightarrow 8)$, éventuellement acétylé. Enfin, on observe ce même polymère à la surface de certaines cellules tumorales.

On a examiné de près l'acide polysialique $\alpha - (2 \rightarrow 8)$ avec l'espoir d'obtenir un bon immunogène par modification. Il se combine à un anticorps du sérum de cheval, et, de la manière traditionnelle, on a cherché à reconnaître l'épitope en essayant d'inhiber la combinaison par des oligosaccharides. Normalement un épitope oligosaccharidique correspond au plus à 5-6 résidus monosaccharidiques, or l'oligomère **12.25** ($n = 5$) n'est pas actif, il faut au moins $n = 10$ pour observer une inhibition. On pense être en présence d'un *épitope conformationnel*, c'est-à-dire que ce n'est pas seulement la séquence oligosaccharidique qui compte, mais la forme générale. Celle de l'épitope de l'acide polysialique $\alpha - (2 \rightarrow 8)$ serait une hélice très allongée, avec 8-12 résidus par tour.

On trouve, dans un bactériophage, une enzyme endosialidase $\alpha - (2 \rightarrow 8)$, qui hydrolyse avec un degré de spécificité élevé les liaisons internes de cet acide polysialique. Le site de clivage doit être flanqué par au moins cinq résidus sialosides du côté terminal non réducteur et trois de l'autre. On retrouve le site de reconnaissance exceptionnellement étendu déjà observé dans la réaction immunochimique.

12.5.3 La molécule d'adhésion des cellules nerveuses, N - CAM

L'adhésion entre cellules joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire du système nerveux. Plutôt que d'impliquer un grand nombre de molécules d'adhésion, on pense plutôt maintenant qu'il y en a seulement un petit groupe de spécificités différentes et que la variété de phénomènes observés repose sur une coordination de leur expression avec des événements cytoplasmiques. Les molécules N - CAM sont les mieux connues^[26].

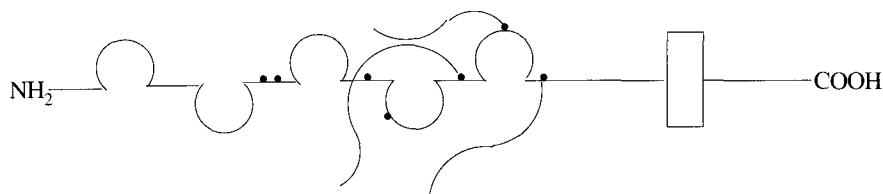
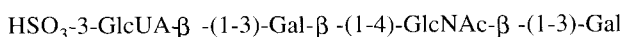


Figure 12.3 Représentation schématique de la molécule N-CAM₁₈₀. Les points noirs correspondent à des sites de glycosidation. Extrait de C. M. Regan, *Int. J. Bioch.*, 23 (1991) 513-523 (publiée avec l'aimable autorisation d'Elsevier Science Ltd, Kidlington, UK).

La figure 12.3 donne une représentation schématique^[27] de l'une d'entre elles, N-CAM₁₈₀, l'indice 180 rappelant la masse moléculaire, voisine de 180 000, de la charpente polypeptidique. C'est une protéine transmembranaire composée d'une seule chaîne polypeptidique de 1072 acides aminés. Partant de l'extrémité NH₂, qui baigne dans le milieu extérieur, il y a d'abord une région d'environ 400 résidus acides aminés. Il y a dans cette région une chaîne latérale oligosaccharidique, probablement liée à l'asparagine 203, qui porte l'épitope tétrasaccharidique sulfaté dit L2/HNK-1, **12.26**, qui n'est pas sialylé. C'est dans cette région aussi que se trouvent les domaines impliqués dans l'adhésion entre cellules, selon un mécanisme dit « homophile ». Ceci signifie qu'une molécule N-CAM sur une cellule s'attache à une molécule N-CAM sur une autre cellule. Cette adhésion ne fait donc pas intervenir d'acide sialique. Poursuivant la chaîne vers l'extrémité carboxylique, on rencontre de nouvelles chaînes glycosylées au niveau des asparagines 404, 430 et 459. Celles-ci se terminent par des chaînes polysialiques, avec la liaison $\alpha-(2 \rightarrow 8)$. A peu près au résidu 692, la charpente polypeptidique aborde la traversée de la membrane cellulaire, dont elle sort vers le résidu 710, et prolonge une longue racine de 300 résidus environ dans le cytoplasme.



12.26

La quantité totale d'acide sialique varie au cours du développement embryonnaire, entre les limites < 10 % et 30 %. Des observations ont montré que ces chaînes d'acide polysialique s'opposent à l'adhésion. Donc leur biosynthèse apparaît comme un mécanisme de régulation des propriétés adhésives de la région du polypeptide terminée par NH₂. Il est concevable, en termes très généraux, qu'un développement correct du système nerveux implique parfois adhésion, parfois répulsion. Le mécanisme exact n'est pas connu avec certitude. Il peut y avoir un simple effet mécanique. La croissance de la chaîne polysialique augmente beaucoup le volume de la molécule N-CAM et ceci pourrait maintenir la surface d'une cellule voisine trop loin pour qu'il y ait interaction. Ce volume est en partie la conséquence d'une forte hydratation. Il pourrait y avoir répulsion par les charges négatives des carboxylates ou encapsulation des sites d'adhésion par des chaînes polysialiques, ou modifications conformationnelles.

RÉFÉRENCES

- [1] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40 (1982) 132-232.
- [2] S. David, C. Augé et C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 49 (1991) 176-237.
- [3] C. Augé, S. David et C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.*, 25 (1984) 4663-4664.
- [4] C. Augé, S. David, C. Gautheron, A. Malleron et B. Cavayé, *New J. Chem.*, 12 (1988) 733-744.
- [5] U. Kragl, D. Gygax, O. Ghisalba et C. Wandray, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30 (1991) 827-828.
- [6] C. Augé et C. Gautheron, *J. C. S. Chem. Commun.*, 1987) 859-860.
- [7] C. Augé, S. David et A. Malleron, *Carbohydr. Res.*, 188 (1989) 201-205.
- [8] C. Augé, C. Gautheron, S. David, A. Malleron, B. Bouxom et B. Cavayé, *Tetrahedron*, 46 (1990) 201-214.
- [9] S. David, A. Malleron et B. Cavayé, *New J. Chem.*, 16 (1992) 751-755.
- [10] C. Gautheron-Le Narvor, Y. Ichikawa et C.H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 7816-7818.
- [11] C. H. Lin, T. Sugai, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa et C. J. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 10138-10145.
- [12] K. Okamoto et T. Goto, *Tetrahedron*, 46 (1990) 5835-5857.
- [13] Y. Itho et T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, 28 (1987) 6221-6224.
- [14] Y. Itho, M. Numata, *Tetrahedron Lett.*, 29 (1988) 3987-3990.
- [15] Y. Itho, M. Numata, M. Sugimoto et T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 8508-8510.
- [16] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, et M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, 10 (1991) 493-498.
- [17] A. Marra et P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, 195 (1990) 303-308.
- [18] H. Lönn et K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.*, 33 (1992) 115-116.
- [19] S. L. Shames, E. S. Simon, C. W. Christopher, W. Schmidt, G. M. Whitesides et L. L. Yang, *Glycobiology*, 1 (1991) 187-191.
- [20] J. Lin-Chun Liu, Gow-Jenn Shen, Y. Ichikawa, J. F. Rutan, G. Zapata, W. F. Vann et C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 3901-3910.
- [21] C. Augé, C. Gautheron et R. Fernandez, *Carbohydr. Res.*, 200 (1990) 257-268.
- [22] A. Lubineau, C. Augé et P. François, *Carbohydr. Res.*, 228 (1992) 137-144.
- [23] Y. Ichikawa, G. J. Shen et C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 4698-4700.
- [24] Y. Ichikawa *et coll.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 9283-9298.
- [25] *Polysialic Acid, from Microbes to Man*, ouvrage collectif publié sous la direction de J. Roth, U. Rutishauser et F. A. Troy II, Birkhäuser Verlag, Bâle 1993.
- [26] B.A. Cunningham, J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury, G. M. Edelman, *Science*, 236 (1987) 799-806.
- [27] C. M. Regan, *Int. J. Bioch.*, 23 (1991) 513-523.

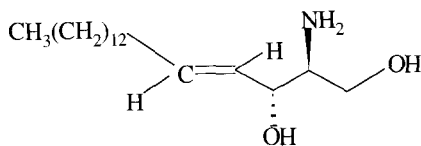
Glycoconjugués

13.1 GLYCOLIPIDES

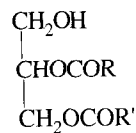
13.1.1 Définitions, isolement

C'est l'association d'un oligosaccharide et d'une molécule lipidique^{[1] [2]}. On se bornera à deux familles dont la définition ne pose aucun problème. Dans le *type sphingosine*, l'oligosaccharide est lié de façon glycosidique à la fonction alcool primaire d'un aminoalcool à longue chaîne. Le plus communément observé est la sphingosine **13.1**. Dans les glycolipides, la fonction amine est engagée dans une liaison amide avec un résidu acyle dérivé d'un acide gras à longue chaîne. Il y a une grande variété de dérivés de ce type, auxquels on donne le nom collectif de *céramide (Cer)*. L'autre famille importante de glycolipides appartient au type glycérol. L'oligosaccharide est lié par liaison glycosidique à la fonction alcool primaire d'une molécule de glycérol estérifiée par deux molécules d'acides gras, **13.2**.

Suivant les poids respectifs de la partie lipophile et de la partie hydrophile dans le glycolipide, le protocole d'extraction sera variable. On procède généralement à une première extraction des tissus avec un mélange chloroforme-méthanol (2:1) et on extrait à nouveau le résidu en introduisant de l'eau (5 %) dans le mélange de solvants. Le relargage avec du chlorure de sodium sépare une phase chloroformique qui contient les glycolipides neutres, d'une phase aqueuse-méthanolique qui contient les glycolipides acides ou très hydrophiles. On poursuit avec les techniques habituelles de séparation, chromatographie sur gel, dialyse, chromatographie sur colonne de diéthylaminoéthylcellulose, c.c.m. Une méthanolyse acide sépare la sphingosine et les acides gras de l'oligosaccharide. La caractérisation de l'oligosaccharide utilise les principes généraux décrits au chapitre 9. Le lecteur se rappellera qu'on a avantage à analyser directement le glycolipide par f.a.b.



13.1



13.2

<i>globo</i>	GalNAc-β-(1→3)-Gal-α-(1→4)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1-Cer)
<i>isoglobo</i>	GalNAc-β-(1→3)-Gal-α-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1-Cer)
<i>lacto</i>	Gal-β-(1→3)-GlcNAc-β-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1-Cer)
<i>néolacto</i>	Gal-β-(1→4)-GlcNAc-β-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1→Cer)
<i>ganglio</i>	Gal-β-(1→3)-GalNAc-β-(1→4)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1→Cer)
<i>muco</i>	Gal-β-(1→3)-Gal-β-(1→4)-Gal-β-(1→4)-Glc-β-(1→Cer)
<i>gala</i>	Gal-α-(1→4)-Gal-α-(1→4)-Gal-β-(1→4)-Gal-β-(1→Cer)

Tableau 13.1 Familles de glycosphingolipides neutres*. (* Tous les résidus sont des pyranoses de la série D.)

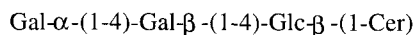
13.1.2 Glycolipides animaux

Les glycolipides neutres des tissus animaux (sans acide sialique) sont presque exclusivement des glycosphingolipides. Le classement en familles repose sur l'enchaînement des résidus monosaccharidiques attachés à la céramide. L'unité directement liée à la céramide est dans la grande majorité des cas β-D-Glcp et exceptionnellement β-D-Galp. Le résidu suivant est toujours β-D-Galp si bien que les familles les plus nombreuses de glycosphingolipides commencent par une unité β-lactosyl. Le tableau 13.1 n'est guère mémorisable, mais il peut donner au lecteur une idée de la variété des structures que l'on rencontre.

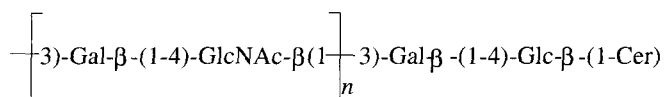
On rencontre ces glycolipides tétrasaccharidiques, tels quels, ou avec des chaînes de sucres raccourcies ou prolongées dans divers tissus de l'homme et des animaux supérieurs : le trihexoside *globo* **13.3** est le glycolipide le plus important des globules rouges humains ; le tétrahexoside *lacto* se prolonge en support des épitopes des substances de groupes sanguins, ABH, Lewis, Ii et Pi ; la famille *muco* porte les épitopes des groupes A et H. Il est remarquable d'observer des glycolipides dont la charpente peut compter jusqu'à 20 unités répétitives de N-acétyllactosamine liées l'une à l'autre par une liaison β (1→ 3'), selon la formule schématisée **13.4**.

13.1.3 Gangliosides

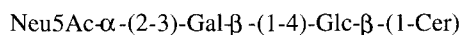
C'est le nom donné aux glycolipides sialylés. Le support de l'acide sialique est généralement un glycosphingolipide de la famille *ganglio*. La séparation de ces glycolipides et leur fractionnement en dérivés mono-, di-, trisialiques, etc., repose sur leur caractère acide et utilise des colonnes d'échangeurs d'anions (DEAE-cellulose). Les acides sialiques présents sont Neu5Ac, Neu5Gc et leurs acétates. L'hématoside **13.5** est présent dans le cerveau et les érythrocytes du chien. On le rencontre aussi sur les érythrocytes du cheval et du bœuf, où Neu5Ac est remplacé respectivement par Neu5Gc et Neu4Ac5Gc. Le ganglioside le plus important du cerveau, appelé GM1, est un produit de sialylation **13.6** du glycolipide *ganglio* du tableau 13.1 avec une liaison glycosidique α-(2→3). On observe aussi des



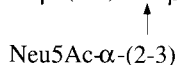
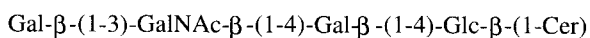
13.3



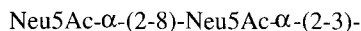
13.4



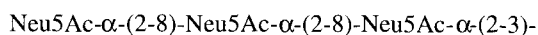
13.5



13.6



13.7



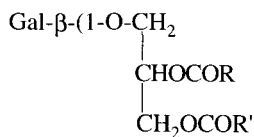
13.8

séquences polysialylées avec liaison inter-sialosidique $\alpha\text{-(2}\rightarrow\text{8)}$ **13.7** et **13.8**, accrochées en 3 du même galactose non terminal du glycolipide *ganglio*, et des prolongements sialiques et disialiques analogues à partir de la position 3 du galactose terminal non réducteur. Pour conclure, aussi bien dans la famille des glycosphingolipides que dans celles des gangliosides, il y a une très grande variété de structures des oligosaccharides construit sur les chaînes de base. Signalons la présence de L-fucose sur certains et d'esters sulfuriques.

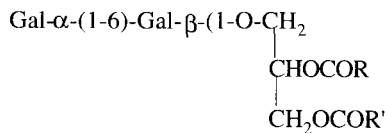
Dans la synthèse des gangliosides, le couplage de l'unité réductrice est pratiqué sur un précurseur azido de la céramide, par la méthode au trichloracétimide (voir le paragraphe 10.3.2).

13.1.4 Glycolipides végétaux

Nous nous bornerons à mentionner les galactosylglycérols **13.9** et **13.10**.



13.9



13.10

13.2 GLYCOPROTÉINES^[3]

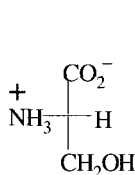
13.2.1 Généralités

On appelle glycoprotéines des protéines liées de façon covalente à des oligosaccharides. Il y a un grand nombre de preuves que ces branchements oligosaccharidiques sont à l'origine de propriétés biologiques importantes ; le lecteur en trouvera de nombreux exemples dans les chapitres suivants. Les glycoprotéines sont omniprésentes dans le monde vivant, soit comme composés solubles, soit liées aux parois cellulaires, soit intérieures aux cellules, soit dans les fluides extracellulaires. Pour leur extraction et leur purification, on utilise les méthodes de la chimie des protéines, mais la présence des sucres permet d'utiliser un outil supplémentaire d'une grande puissance, la chromatographie d'affinité sur une *lectine* immobilisée. Les lectines (voir le chapitre 15) sont des protéines, animales ou végétales, mais facilement accessibles lorsqu'elles viennent du règne végétal, qui se combinent réversiblement à des monosaccharides ou à des séquences d'oligosaccharides. A chacune correspond un ligand sucre spécifique. Une colonne de lectine immobilisée retient spécifiquement la glycoprotéine à laquelle est attaché ce ligand. L'élution a lieu avec une solution du ligand spécifique (une petite molécule) qui déplace la glycoprotéine des sites de reconnaissance de la lectine.

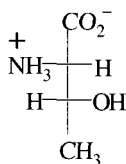
Six sucres participent à l'architecture des oligosaccharides des protéines animales totalement élaborées : galactose, mannose, *N*-acétylglucosamine *N*-acétylgalactosamine et acide sialique, de la série D, et fucose, de la série L, tous sous forme pyranosique. Il y a deux types principaux de jonction au polypeptide, qui peuvent d'ailleurs parfois coexister dans la même glycoprotéine. Dans tous les cas, on cherche à séparer l'oligosaccharide aussi peu dégradé que possible et on analyse sa séquence par les méthodes exposées au chapitre 9. La séquence contiguë à la jonction s'appelle le « cœur » de l'oligosaccharide. Le concept de cœur^[3] trouve sa justification dans l'observation qu'il n'y a qu'un très petit nombre de cœurs. Chacun se présente comme un « invariant » au sein d'une grande multiplicité de formes.

13.2.2 Protéines glycosides

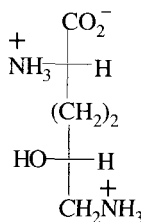
L'oligosaccharide est engagé à son extrémité « réductrice » dans une liaison glycosidique avec un des résidus à chaîne latérale hydroxylée du polypeptide. Ce



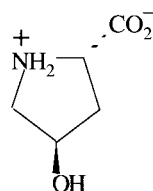
13.11



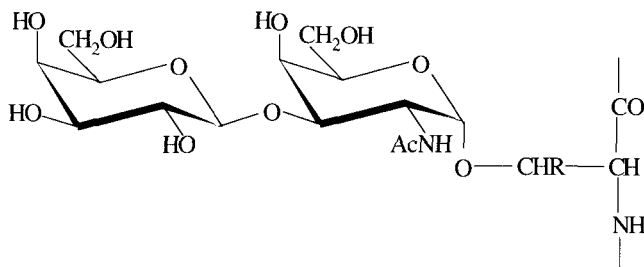
13.12



13.13



13.14



13.15

sont ceux qui dérivent de la L-sérine, **13.11**, de la L-thréonine, **13.12**, de la L-hydroxylysine, **13.13**, et de la L-hydroxyproline, **3.14**. La formule **13.15** représente un type de jonction extraordinairement répandu, sur la L-sérine ($R = H$) ou la L-thréonine ($R = CH_3$). Dans certaines glycoprotéines, l'unité β -D-Gal est remplacée par β -D-GalNAc. A partir de ce disaccharide, des prolongements et des ramifications conduisent à une très grande variété de structures. Pour les déterminer, il faut détacher l'oligosaccharide du polypeptide. L'hydrolyse catalysée par une enzyme protéolytique à large spécificité, la pronase, peut éventuellement libérer un *glycopeptide*, c'est-à-dire l'oligosaccharide encore lié à l'acide aminé de jonction, mais parfois l'oligosaccharide exerce une fonction de protection contre la protéolyse enzymatique. Le mode de clivage le plus caractéristique des glycosides des résidus L-sérine et L-thréonine est l'élimination β en milieu alcalin. C'est une conséquence attendue de la labilité du proton α du carbonyl amidique, qui est décroché par la base B (Fig. 13.1.a). Malheureusement, on ne s'arrête pas là. Le sucre dont la fonction réductrice a été libérée est en équilibre avec le tautomère aldéhydique, qui présente lui aussi un proton α acide, et il se produit une nouvelle élimination β (Fig. 13.1.b), et ainsi de suite. C'est le « pelage », que l'on tâche d'éviter en opérant en présence de $NaBH_4$, avec l'espoir que la réduction du carbonyl aldéhydique sera plus rapide que l'élimination β .

La synthèse du disaccharide peptide correspondant à **13.15** pose le problème de la glycosidation *cis* 1,2. On utilise le disaccharide activé à groupement azido non participant **13.16**, qui est condensé sur une sérine ou une thréonine protégée sur l'azote et le carboxyle, avec le mélange promoteur $AgClO_4/Ag_2CO_3$. Pour réduire-

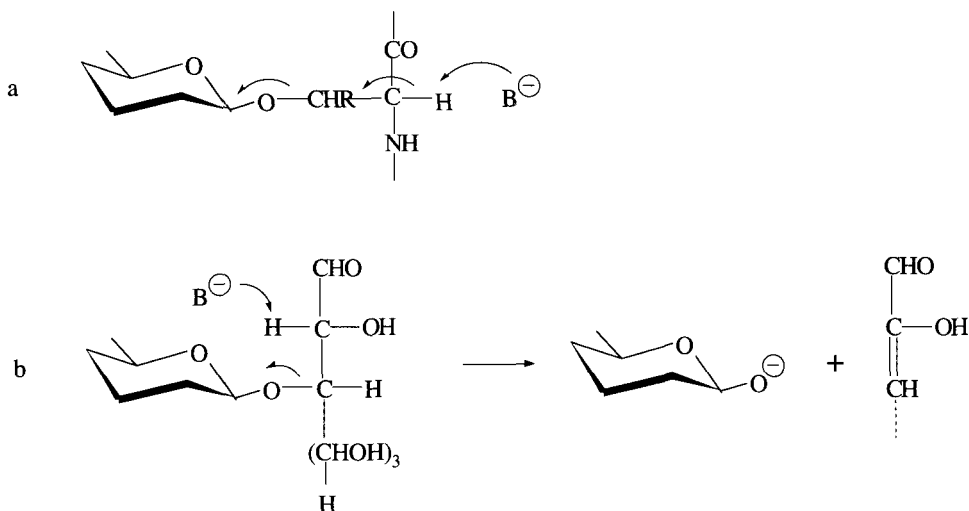
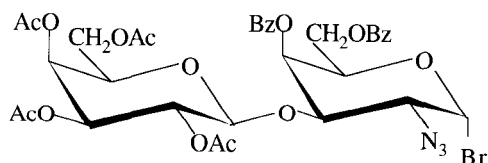
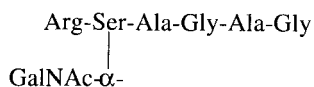


Figure 13.1 Elimination β (a) et « pelage » (b) des glycosides de la sérine et de la thréonine.



13.16

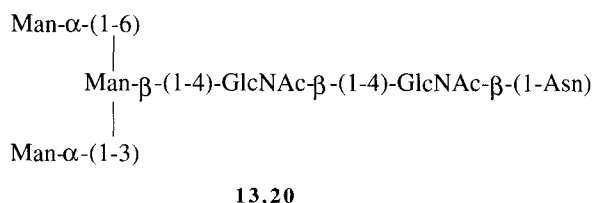
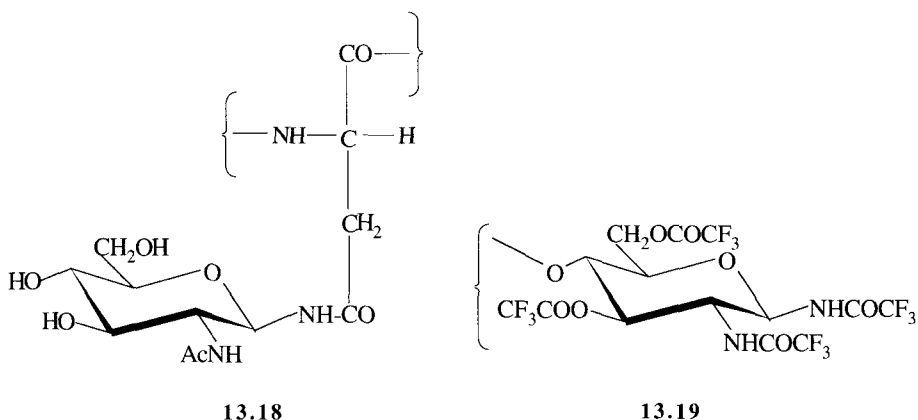


13.17

re le groupement azido en amino avant la *N*-acétylation, on utilise H_2S . On peut aussi prolonger du côté du polypeptide avec les méthodes habituelles de la synthèse peptidique^{[4] [5]} et obtenir, par exemple, **13.17**.

13.2.3 Protéines glycosaminides

Le sucre à la jonction est la *N*-acétylglucosamine et la structure partielle est **13.18**, le sucre étant substitué comme on le verra un peu plus loin. On peut décrire **13.18** soit comme une amide de glycosylamine dérivée de l'acide aspartique



soit, de façon préférée, comme un produit de glycosylation de l'asparagine. Une méthode pour détacher l'oligosaccharide pas trop dégradé est la trifluoracétylase^[6], qui consiste à maintenir 2 j à 100° dans un mélange d'anhydride et d'acide trifluoracétique, 50:1. L'oligosaccharide est perfluoracétylé et l'effet inducteur des radicaux fluoracétyles stabilise les liaisons interglycosidiques en déstabilisant l'intermédiaire protoné de l'hydrolyse, formule partielle **13.19**. Cependant, on coupe ainsi la liaison avec l'asparagine. Un traitement rectificatif ultérieur du produit de coupure est nécessaire pour hydrolyser les groupements esters et amides de l'acide trifluoracétique et ré-acétyler à l'azote. Le cœur des branchements sur l'asparagine est un pentasaccharide **13.20**. On trouve du côté réducteur deux résidus N-acétylglucosamine enchaînés comme dans le chitobiose, puis un résidu β -mannose. Sur ce β -mannose sont attachés en 3 et 6 deux résidus α -mannose. Selon la structure des prolongations et branchements sur ce cœur **13.20**, on distingue deux sous-familles principales. Dans la première, on ne rencontre que des résidus α -mannose. Dans la seconde, le pentasaccharide est substitué par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine, Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc, avec en plus, des résidus fucose, acide sialique, etc.

Nous avons déjà abordé les problèmes synthétiques relatifs à ces oligosaccharides. Nous avons donné, à propos des glycosylamines, la préparation des glucosides de l'asparagine au paragraphe 3.6.2 et, comme exemple de synthèse, par les méthodes enzymatiques, la synthèse d'une séquence périphérique, **12.20**.

13.2.4 Problèmes conformationnels

Dans les protéines glycosaminides, l'oligosaccharide s'attache à une asparagine solidaire d'un résidu tripeptidique particulier, Asn-X-Ser (Thr). Mais tous les enchaînements de ce type ne sont pas nécessairement glycosidés. Il y a d'autres conditions apparemment liées à la structure secondaire de la chaîne polypeptidique. En général, dans les protéines, celle-ci adopte une conformation préférée où apparaissent des formes géométriques variées : hélices, plis, tournants, épingles à cheveux et boucles. Les séquences de résidus d'acides aminés au voisinage des sites glycosylés sont le plus souvent celles que l'on observe dans certains tournants des chaînes de protéine (Fig. 13.2) et les autres sont au voisinage des boucles. Ce sont, en fait, des régions plus accessibles du polypeptide, ce qui pourrait expliquer à la fois la glycosylation préférentielle et le rôle important de l'oligosaccharide, très exposé, en diverses circonstances. Ce que nous venons de dire s'applique aussi aux protéines glycosides.

En ce qui concerne la conformation de l'oligosaccharide^[4], qui a certainement une importance capitale dans les problèmes de reconnaissance, un certain nombre de phénomènes significatifs se manifestent. Les résultats proviennent de mesures de RMN avec des techniques modernes perfectionnées, en particulier par la mesure de l'effet Overhauser, de calculs de modélisation et de la comparaison avec la structure à l'état solide du trisaccharide **13.21**. Les valeurs des angles dièdres φ et ψ , qui caractérisent la liaison interglycosidique (voir le paragraphe 9.2) sont conformes aux prédictions de la théorie de l'effet exoanomérique. La glycosida-

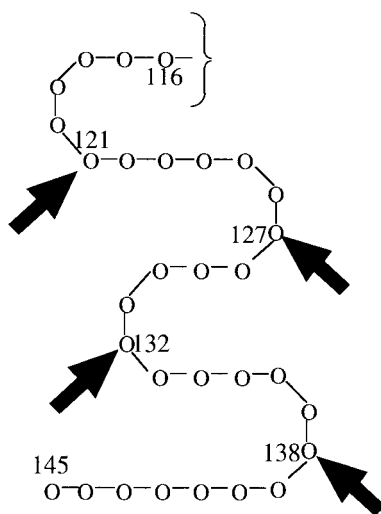
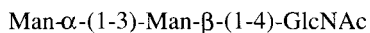
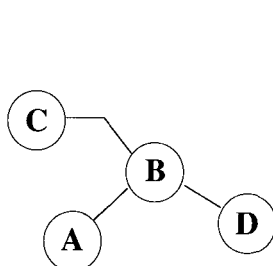


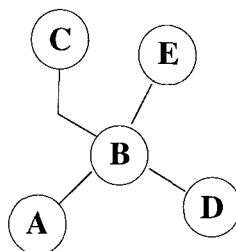
Figure 13.2 Représentation partielle de la sous-unité β de l'hormonocorticotrope, glycosidée aux résidus acides aminés 121, 127, 132 et 138. D'après J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223 (publié avec l'aimable autorisation de Academic Press).



13.21

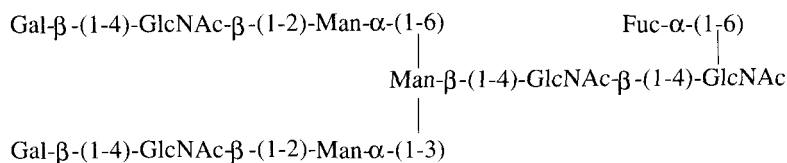


13.22



13.23

Figure 13.3 Conformations au point de ramification du cœur des glycosaminides des protéines **A** : GlcNAc ; **B** : Man- β -(1-4) ; **C** : Man- α -(1-6) ; **D** : Man- α -(1-3) ; **E** : GlcNAc- β -(1-4).



13.24

tion sur les fonctions alcool primaire introduit de la flexibilité, à cause des possibilités de rotation autour de la liaison C(5)-C(6). Ainsi le tétrasaccharide **13.22** (Fig. 13.3) qui représente le point de branchement du cœur des oligosaccharides liés à l'asparagine, adopte-t-il la conformation esquissée, où l'on voit l'unité Man- α -(1-6) (**C**) se replier sur GlcNAc. Dans certains oligosaccharides, dits « bisectés », il y a une substitution supplémentaire sur O(4) du mannose central. Dans le modèle **13.23**, on observe que le résidu **C** se retourne alors vers le nouveau substituant GlcNAc (**E**).

On a pu préciser aux rayons X la structure solide complète d'une immunoglobuline IgG₁ (voir le paragraphe 15.2) cristallisée. Nous nous bornerons à esquisser la topologie de l'ensemble constitué par les deux chaînes lourdes et les deux molécules de décasaccharide **13.24** liées à un résidu asparagine que porte chacune d'elles. La figure 13.4 montre que les décasaccharides se trouvent sur la face interne du croissant formé par les deux chaînes lourdes et se font vis-à-vis, mais sans contact. Le disque **B** représente le point de branchement, Man- β -

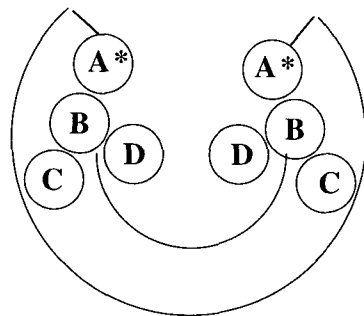


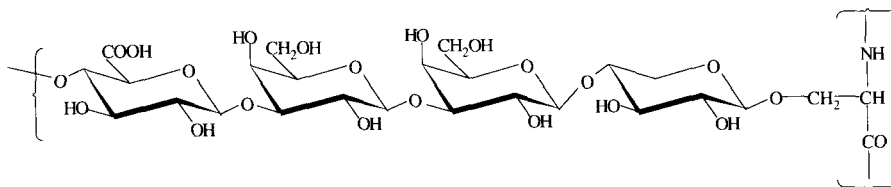
Figure 13.4 Disposition du décasaccharide 13.24 à l'intérieur des deux chaînes F_c de l'immunoglobuline IgG_1 . A^* : chitobiose de jonction ; B , C , D identiques à la figure 13.3 : $Man-\beta-(1-4)$; $Man-\alpha-(1-6)$; $Man-\alpha-(1-3)$.

(1→4). Le disque A^* correspond au chitobiose accroché à l'asparagine. L'intérêt considérable de la conformation vient du rôle dissymétrique joué par les deux trisaccharides identiques liés en 3 et 6 du mannose. La chaîne flexible liée en 6 par l'intermédiaire du mannose C repose sur une partie *hydrophobe* du polypeptide (riche en résidus phénylalanine, valine, tyrosine). L'autre trisaccharide lié par l'intermédiaire du mannose D , au contraire, baigne dans l'eau de la cavité centrale et, apparemment, se comporte comme *hydrophile*. Le lecteur a déjà vu au chapitre 11 les ambiguïtés des notions hydrophile-hydrophobe lorsqu'il s'agit d'un sucre.

13.3 GLYCOSAMINOGLYCANES ET PROTÉOGLYCANES

13.3.1 Données générales

Les macromolécules traitées dans ce paragraphe sont essentiellement extracellulaires. En association avec les fibres de collagène (une glycoprotéine), elles contribuent à la nature, à la structure et à la rigidité des tissus. Ce sont des associations sucres-protéine comme les glycoprotéines, mais elles s'en distinguent de façon assez caractéristique pour qu'on les range dans une classe particulière. La proportion de protéine est généralement faible et peut descendre jusqu'à 2 %, alors qu'il y a 50-95 % de sucre. Cependant, à ce point de vue là, les limites entre les deux catégories de glycoconjugués sont floues. Ce qui est plus caractéristique, ce sont les longues chaînes linéaires des protéoglycanes, construites par la répétition d'un motif disaccharidique périodique. Parfois des altérations en apparence aléatoires restreignent la périodicité au sens strict, mais elle reste clairement discernable sous les modifications^[7]. On appelle « glycosaminoglycane » le polysaccharide et « protéoglycane » le conjugué entier. Comme les glycoprotéines, les protéoglycanes comportent soit des liaisons glycosaminides impliquant la L-asparagine, soit des liaisons glycosides sur l'oxygène alcoolique de la L-sérine ou de la L-thréonine. La chaîne périodique, ou pseudopériodique, ne s'accroche pas directement sur la protéine, mais il y a un oligosaccharide de cœur, comme dans les glycoprotéines.

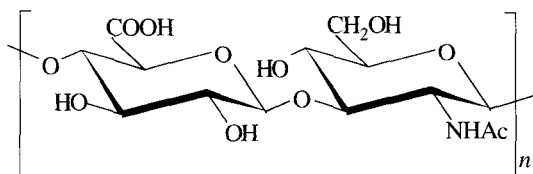


13.25

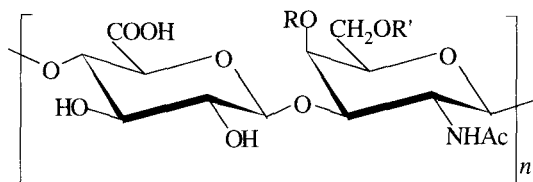
La liaison sur la L-asparagine a lieu par l'intermédiaire d'un oligosaccharide riche en mannose, qui est probablement le même, **13.20**, que dans les glycoprotéines. Par contre, la structure de cœur la plus fréquente sur L-sérine et L-thréonine est tout à fait différente, **13.25**. Le lecteur remarquera les unités β -D-xylopyranosyle et β -D-glucuronopyranosyle. La longue chaîne est liée à l'oxygène O(4) de l'unité β -D-glucuronopyranosyle. On reviendra sur ces structures au chapitre 17, à propos de l'héparine, qui appartient à cette famille.

13.3.2 Chaînes périodiques ou quasipériodiques

L'acide hyaluronique a la structure fondamentale **13.26**. Il peut y avoir plusieurs milliers d'unités disaccharidiques. Dans la chondroïtine **13.27**, la *N*-acétylglucosamine est remplacée par la *N*-acétylgalactosamine. Il y a deux dérivés naturels sulfatés de la chondroïtine. Dans l'un, l'unité disaccharidique est sulfatée sur O(4) et, dans l'autre, sur O(6) du résidu *N*-acétylgalactosamine, **13.28** et **13.29**. Les chaînes sont considérablement plus courtes que dans l'acide hyaluronique (10-60 périodes). Dans le dermatane-sulfate, on retrouve le motif de base **13.28**



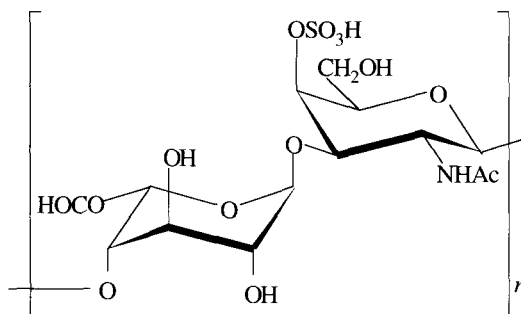
13.26



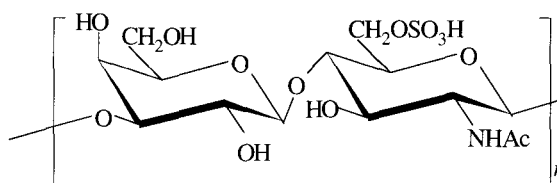
13.27 $R = R' = H$

13.28 $R = SO_3H, R' = H$

13.29 $R = H, R' = SO_3H$



13.30



13.31

mais un certain nombre de molécules de résidus D-glucuroniques ont subi une inversion de configuration sur C(5), ce qui donne un résidu L-iduronique et un motif de base **13.30**. La fraction transformée varie de quelques unités à 100 %. La structure de glycosaminoglucane de l'héparine est exposée au chapitre 17. Le kératane-sulfate est exceptionnel. Le motif **13.31** ne comporte pas de fonction acide carboxylique, la liaison interne est $\beta(1\rightarrow4)$ et la liaison avec le reste de la chaîne $\beta(1\rightarrow3)$. La condensation est faible (10 ou bien 30-50 motifs). Ce polysaccharide est structuralement une chaîne poly-(N-acétyllactosamine) comme nous en avons déjà rencontrées aux paragraphes 13.1 et 13.2, sulfatée sur O(6) de GlcNAc.

RÉFÉRENCES

- [1] I. M. Morisson, « The Glycolipids and Gangliosides » dans *Carbohydrate Chemistry*, sous la direction de J. F. Kennedy, Clarendon Press, Oxford, 1988, chapitre 5.
- [2] Y.T. Li et S. C. Li, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40 (1982) 235-244.
- [3] J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- [4] H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 29 (1990) 823-839.
- [5] A. M. Jansson, M. Meldal et K. Bock, *Tetrahedron Lett.*, 48 (1990) 6987-6990.
- [6] B. Nilsson et S. Svensson, *Carbohydr. Res.*, 72 (1979) 183-190.
- [7] J.F. Kennedy et C.A. White, « The Glycosaminoglycans and Proteoglycans » dans *Carbohydrate Chemistry*, sous la direction de J. F. Kennedy, Clarendon Press, Oxford, 1988, chapitre 8.

Structure de quelques complexes sucre-protéine cristallisés

14.1 GÉNÉRALITÉS. LE COMPLEXE ABP-L-ARABINOSE

14.1.1 Protéines et sucres

Nous rencontrons dans ce livre quatre types de protéines qui s'associent aux sucres : les enzymes de métabolisme des sucres, les lectines, les anticorps spécifiques et les protéines de transport. On a pu cristalliser un nombre important de ces protéines et les examiner aux rayons X pour déterminer leur structure tertiaire. Compte tenu de leur masse moléculaire élevée, l'analyse des spectres de diffraction est un travail difficile. Cependant, on est guidé par la connaissance de la structure primaire, c'est-à-dire l'enchaînement peptidique, obtenue par les procédés chimiques. Le pouvoir de résolution des méthodes est en moyenne de 2,5 Å. Il est meilleur dans les exemples que nous donnerons. La connaissance de la structure de la protéine ne donne que des présomptions sur celle du complexe, d'autant plus qu'il peut y avoir des modifications de conformation à la complexation. On a pu obtenir à l'état cristallisé certains complexes protéine-sucre et décrire leur structure avec des degrés de résolution comparables. En général le site récepteur sur la protéine est une cavité allongée, plus ou moins profonde, mais le reste de la protéine semble éminemment variable suivant sa fonction biologique^[1]. On connaît et on a étudié des combinaisons cristallines appartenant aux quatre types de protéines mentionnés ci-dessus. Dans le domaine des enzymes, mentionnons le complexe entre le poly-*N*-acétylchitobiose et le lysozyme, enzyme capable d'hydrolyser les parois bactériennes, qui a six sites récepteurs, et entre une maltodextrine et la takaamylase, enzyme qui hydrolyse l'amylose et peut s'associer une unité hexasaccharidique. Ces études ont une importance capitale pour l'élucidation du mécanisme de l'hydrolyse enzymatique. Cependant, comme il s'agit d'articles déjà anciens que le lecteur non cristallographe aura quelques difficultés à jauger, nous préférons renvoyer aux commentaires qui en ont été faits^[1]. L'esprit de ce chapitre est de décrire avec précision l'environnement immédiat du sucre et c'est en fonction de ceci que nous avons choisi les exemples. Nous recommandons au lecteur d'examiner les vues stéréoscopiques et en couleur des mémoires originaux.

14.1.2 Le complexe protéine ABP-L-arabinose

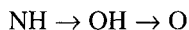
Un groupe américain^{[1] [2]} a considéré avec énormément d'attention un complexe du L-arabinose avec une protéine dite ABP (*arabinose-binding protein*), qui a pu être décrit avec une résolution de 1,7 Å. Les auteurs pensent que les modes de liaison qu'ils ont observés ont une valeur générale. C'est pourquoi nous commenceront ce chapitre par un exposé simplifié de leurs conclusions, bien que le L-arabinose ne participe pas à des phénomènes de reconnaissance chez les animaux supérieurs.

Une famille assez étendue de protéines, localisées dans l'espace périplasmique des bactéries gram-négatives, complexent certaines petites molécules et permettent leurs transport actif à travers la paroi cellulaire ou le déclenchement de mouvements chimio-tactiques. Chacune de ces fonctions implique une interaction ultérieure avec des protéines membranaires spécifiques. Les molécules transportées sont des acides aminés, le sulfate, des mono- et oligosaccharides. Ainsi la protéine ABP (*arabinose-binding-protein*) complexe le L-arabinose (K_d $0,98 \times 10^{-7}$ M), la protéine MBP complexe le maltose (K_d 35×10^{-7}) et les maltodextrines. C'est dans cette série qu'on trouve les liaisons les plus fortes observables entre sucre et protéine. La vitesse de dissociation (k_{-1} $1,5 \text{ s}^{-1}$) indique la limite supérieure de la vitesse du transport ionique.

Les liaisons hydrogène

Elles jouent un rôle très important dans le complexe ABP-L-arabinose : *tous les groupements polaires sont utilisés*. D'une façon générale, les hydroxyles sont les groupements fonctionnels caractéristiques des sucres, ils ont des orientations fixes, sont bien exposés et peuvent collaborer chacun à 3 liaisons hydrogène, une comme donneur, deux comme accepteur. Les variations de l'angle dièdre H-C-O-H permettent l'établissement de la structure la plus favorable. La participation à la complexation des liaisons hydrogène fortement directives expliquent la spécificité de l'interaction. On rencontre trois types de système de liaison hydrogène.

Dans les liaisons hydrogène *coopératives*, l'hydroxyle du sucre est simultanément donneur et accepteur selon le schéma :



Les atomes NH et O font partie du site de complexation.

Dans les liaisons *bidentées*, deux hydroxyles contigus, en disposition équatoriale-équatoriale ou axiale-équatoriale, ferment un cycle sur deux atomes d'un groupement polaire plan, selon la disposition **14.1**.

La formation des liaisons coopératives et bidentées crée un *réseau dense* de liaisons hydrogène entre le sucre et les récepteurs essentiels. Ces liaisons sont fortes. La distance moyenne entre les atomes lourds, donneur-accepteur, est 2,82 (0,15) Å, et l'angle moyen 164 (9°). Les résidus à groupes plans polaires, Asn, Asp, Glu, Gln, Arg et His sont particulièrement représentés dans les sites récepteurs (la lysine n'est utilisée qu'une fois). Ces groupes sont liés rigidement

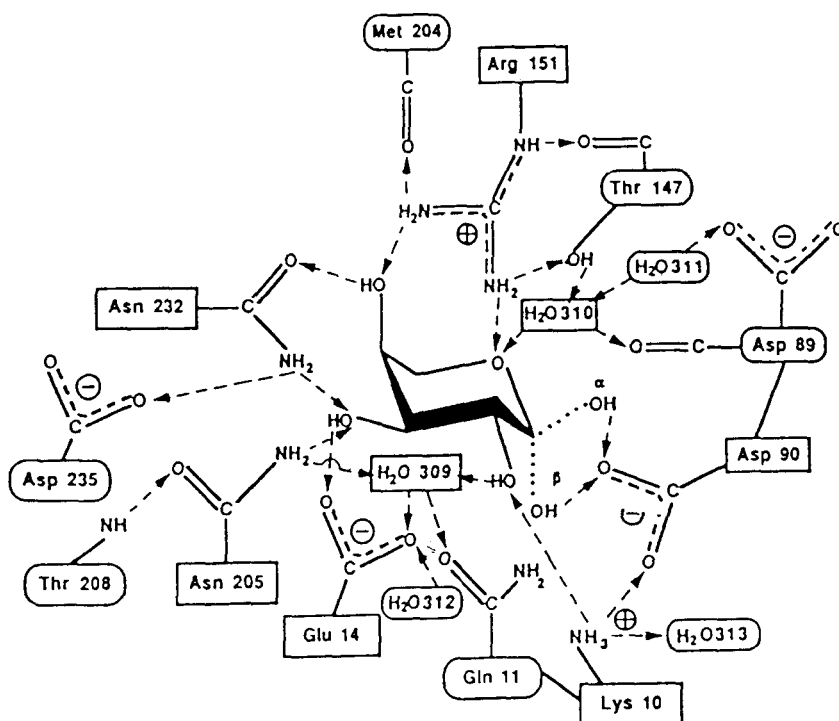


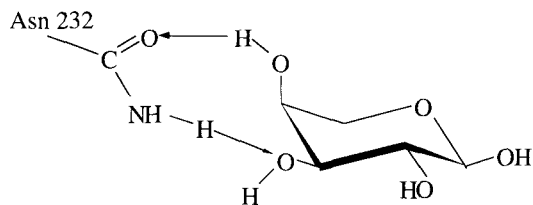
Figure 14.1 Schéma du réseau de liaisons hydrogène dans le complexe L-arabinose ABP. D'après F. A. Quiocho, *Pure Appl. Chem.*, 61 (1985) 1293-1306 (publié avec l'aimable autorisation de International Union of Pure and Applied Chemistry).

et leur adaptation finale au sucre ne peut être réalisée que par un changement conformationnel de la protéine.

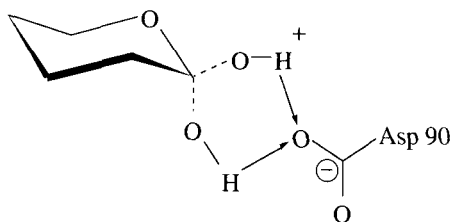
Une propriété commune de toutes ces protéines périplasmiques est leur capacité à complexer les anomères α et β sans différence visible. Ceci s'explique facilement par le schéma des liaisons hydrogène. L'alignement très précis de l'un des oxygènes de l'aspartate lui permet d'accepter une liaison hydrogène aussi bien de l'anomère α que de l'anomère β , sans aucune perturbation du reste du réseau, **14.2**. La figure 14.1 donne un schéma topologique du réseau de liaisons hydrogène. La conformation du sucre est restée normale, 4C_1 , dans le complexe.

Forces de Van der Waals

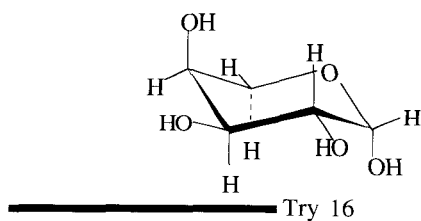
Tous les atomes lourds du L-arabinose sont en contact de Van der Waals ($d < 4 \text{ \AA}$) avec ceux de la protéine-hôte. Il y a à peu près 54 contacts en tout, nombre inhabituellement élevé, dû au réseau dense de liaisons hydrogènes. Celui-ci entraîne une grande compacité. La face « hydrophobe » α du pyranose, où dominant les liaisons C-H, repose en partie sur le noyau indolique du tryptophane.



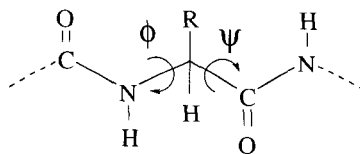
14.1



14.2



14.3



14.4

ne 16. Sur la formule **14.3**, cet indole est représenté par la trace de son plan de symétrie horizontal.

14.2 COMPLEXE DU MALTOSE ET DE LA PROTÉINE DE TRANSPORT DE LA MALTODEXTRINE

14.2.1 Description de la protéine complexante

Elle comporte un enchaînement de 370 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire de 40 622. Sa forme est celle d'un ellipsoïde, de dimensions 65 x 40 x 30 Å, et elle est composée de deux domaines globulaires séparés par un sillon profond. La figure 14.2 donne un mode de représentation de cette protéine.

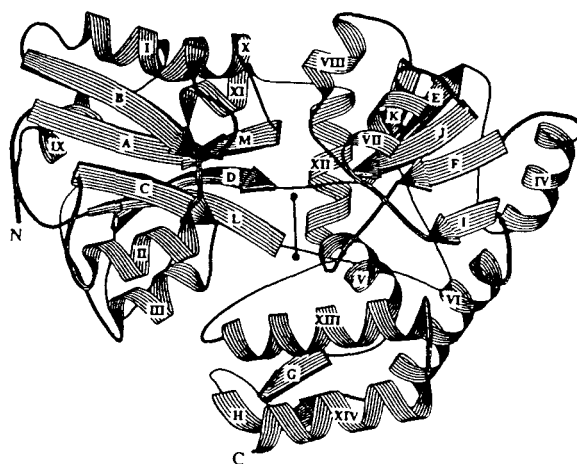


Figure 14.2 Représentation conventionnelle de la protéine de transport des maltodextrines. On représente les plis β par des flèches. L'ordre de succession des plis β dans la chaîne polypeptidique est donnée par des lettres et celui des hélices par des chiffres romains. On a indiqué le site du maltose, au centre, par $\bullet \rightarrow$. Extrait de J. C. Spurlino, G. Y. Lu et F. A. Quiocho, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 5202-5219 (publié avec les aimables autorisations de l'American Society for Biochemistry and Molecular Biology et des auteurs).

On la décrit comme « une protéine α/β » où 40 % des acides aminés sont engagés dans des hélices α , 20 % dans des plis β et le reste forme des boucles ou des pelotes. On remarquera sur la figure 14.2 les deux domaines inégaux, appelés N (à gauche) et C (à droite), selon qu'ils contiennent l'extrémité aminée ou l'extrémité carboxylique de la chaîne peptidique, séparés par le sillon, ici à peu près vertical. La chaîne, à partir de l'extrémité aminée, serpente d'abord dans le domaine N, puis traverse le sillon pour s'engager dans le domaine C au niveau des résidus 110-113, retransverse le sillon en sens inverse au niveau des résidus 268-271 et, après s'être développée dans le domaine N, retourne définitivement au niveau des résidus 311-315 dans le domaine C où elle se termine. Il y a donc trois tripeptides qui assurent la connexion entre les domaines et constituent en même temps le fond de la crevasse. Ils apparaissent sur la figure 14.2 comme trois brins à peu près horizontaux au centre. Ces peptides de jonction sont aussi la charnière qui permet aux deux domaines de se rabattre l'un sur l'autre comme les coquilles d'une huître. En effet, alors que le système CO-NH est rigide, il y a des possibilités de rotation autour du carbone situé entre NH et CO, 14.4.

14.2.2 Complexation des maltodextrines

La protéine de transport que nous venons de décrire complexe toute une famille de maltodextrines. Les paramètres thermodynamiques et cinétiques sont ras-

semblés dans le tableau 14.1. Il est remarquable qu'il y ait si peu de variations du maltose aux cyclodextrines. Les trois premiers complexes du tableau ont été obtenus à l'état cristallisé.

	$10^7 K_d$ (M)	$10^{-7} k_f$ ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-f} (s^{-1})
Maltose	35	2,3	90
Maltotriose	1,6	2,5	8,4
Maltotétraose	23		
Maltopentaose	50		
Maltohexaose	34		
Maltoheptaose	16		
α -Cyclodextrine*	40	3,6	110
β -Cyclodextrine	18	2,2	46

Tableau 14.1 Complexes des maltodextrines avec la protéine de transport du maltose. D'après F. A. Quioco, *Pure Appl. Chem.*, 61 (1989) 1293-1306 (publié avec l'aimable autorisation de l'International Union of Pure and Applied Chemistry). K_d constante de dissociation, k_f et k_{-f} , vitesses de complexation et décomplexation. (* : voir le paragraphe 11.3.)

14.2.3 Mode de complexation du maltose

Au niveau actuel d'élaboration, la conformation du maltose complexé paraît très voisine de celle du maltose libre solide (Fig. 14.3)^[3]. La conformation de chaque cycle est $D-^4C_1$. Les angles dièdres sont $O(5') - C(1') - O(1') - C(4) = +116^\circ$ et $C(1') - O(1') - C(4) - C(3) = +122^\circ$. L'angle glycosidique $C(1') - O(1') - C(4')$ vaut 120° . Il y a une liaison hydrogène intermoléculaire $O(3) - H - O(2')$.

Le récepteur des maltodextrines ressemble à une crevasse dont les parois (hauteur 18 Å) sont les domaines N et C et dont le fond (surface $9 \times 18 \text{ Å}^2$) est constitué par les trois segments peptidiques de jonction et l'hélice XIII. Les dimensions de cette cavité sont suffisantes pour lui permettre d'héberger des cyclodextrines (voir le paragraphe 11.3), comme la β -cyclodextrine (diamètre 15,4 Å, hauteur 7,9 Å)^[4]. Lors de la complexation du maltose au fond de la crevasse, les deux parois se rapprochent l'une de l'autre en pivotant autour de la charnière constituée par les peptides de jonction^[5]. Ce mouvement correspond à une rotation de 35° . Le maltose est enseveli, au point que, de sa surface ($545,5 \text{ Å}^2$), il n'y a plus que 3,6 % qui reste accessible au solvant. La complexation utilise des résidus de chacune des parois et du fond de la crevasse.

Liaisons hydrogène

Comme avec le L-arabinose, l'attachement est essentiellement dû à des liaisons hydrogène. Celles-ci sont presque exclusivement accrochées aux groupes polaires

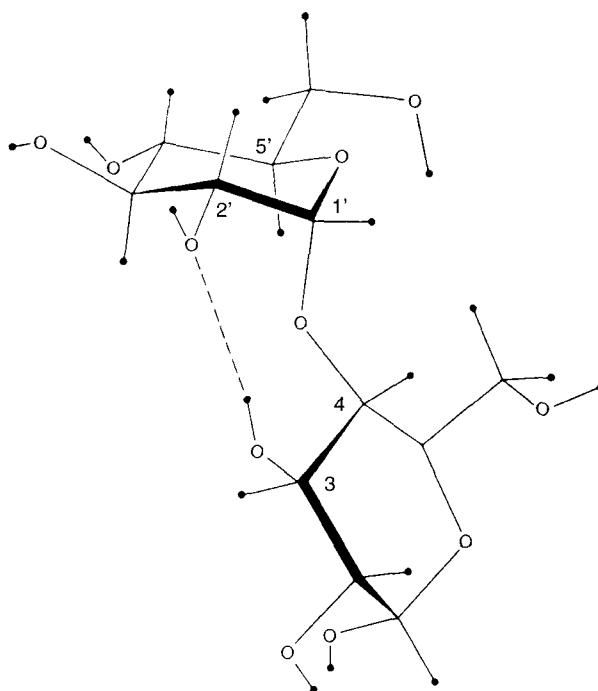


Figure 14.3 Structure du maltose à l'état solide. D'après G. A. Jeffrey et M. Sundaralingam, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 38 (1981) 417-529 (publié avec l'aimable autorisation de l'Academic Press). Dans le texte, les numéros 3 et 4 correspondent au résidu réducteur et les numéros 1' et 5' au résidu non réducteur.

de chaînes latérales. On observe ici une différence avec le mode de complexation du sulfate, à l'état anionique, qui lui s'associe essentiellement aux NH des liaisons peptidiques. L'association du maltose a lieu au moyen de 16 liaisons hydrogène, 11 correspondant à une liaison directe avec les résidus acides-aminés et 5 probablement par l'intermédiaire de molécules d'eau (Fig. 14.4). Les seuls oxygènes non liés sont les oxygènes cycliques et interglycosidiques. Neuf des liaisons hydrogène directes s'établissent entre l'hydroxyle *neutre* du sucre et des résidus *chargés* : carboxylate, ammonium, guanidinium. On retrouve enfin la disposition précise d'un résidu aspartate, qui permet la complexation aussi bien du maltose α que du maltose β avec une égale efficacité.

Contacts Van der Waals

Il y a environ 65 contacts de Van der Waals ($< 4\text{\AA}$). La plupart doivent être considérés comme des conséquences indirectes des liaisons hydrogène, qui tendent à créer l'édifice le plus compact possible. Presque toute la face α de l'unité

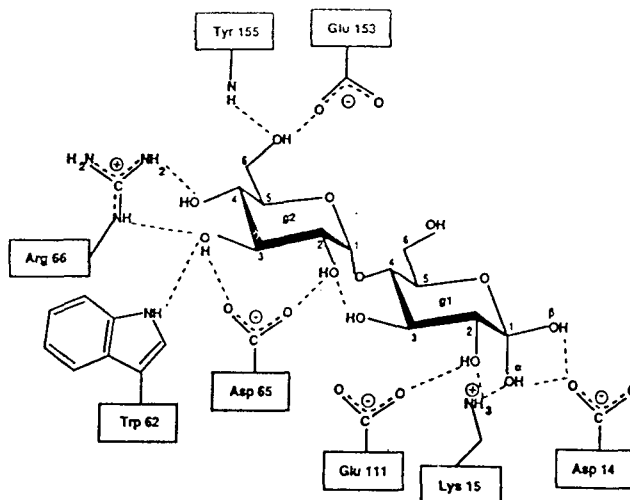


Figure 14.4 Réseau de liaisons hydrogène du maltose complexé. On n'a pas représenté les liaisons par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. D'après J. C. Spurlino, G. Y. Lu et F. A. Quiocho, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 5002-5219 (publié avec les aimables autorisations de l'American Society for Biochemistry and Molecular Biology et des auteurs).

terminale non réductrice repose sur le noyau indole du tryptophane 340. La liaison glycosidique et une partie de la face α de l'unité réductrice reposent sur le noyau phényle de la tyrosine 155. Ces faces α des glucopyranoses constituant le maltose appelées parfois « faces hydrophobes » présentent une série de liaison C-H sur leur surface.

14.3 LE COMPLEXE D'UNE LECTINE ET D'UN OCTASACCHARIDE BIAN TENNAIRE^[6]

Cette lectine est l'« Isolectine I », isolée des graines de *Lathyrus Ochrus*. Elle présente deux sous-unités identiques, composées chacune d'une chaîne légère de 52 acides aminés et d'une chaîne lourde de 181 acides aminés. Chaque sous-unité contient un ion Ca^{++} et un ion Mn^{++} , nécessaires à l'activité. Les ligands examinés sont des fragments du dodécasaccharide-asparagine **14.5** présent dans la lactotransferrine humaine : le mannose, le trisaccharide 234 et l'octasaccharide 234564'5'6'. On a pu obtenir les complexes à l'état cristallisé. On s'occupera ici du complexe avec l'octasaccharide, dont on a pu préparer un cristal de 0,3 mm et donner la structure avec une résolution de 2,3 Å. Nous nous bornerons à des représentations schématiques, topologiquement correctes de la molécule, l'accent portant ici essentiellement sur la nature des liaisons. Le lecteur qui désire plus de précision est invité à examiner les vues stéréoscopiques colorées des articles originaux^{[6] [7]}.

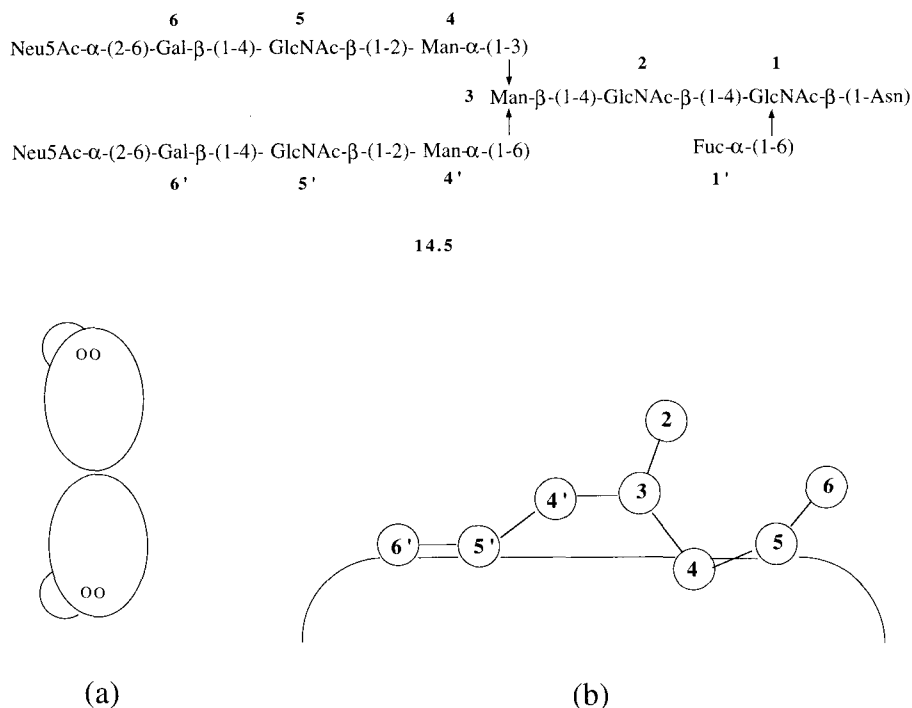


Figure 14.5 Disposition (a) des molécules d'octasaccharide et des cations Ca^{++} Mn^{++} sur la lectine de *Lathyrus Ochrus* et détail (b) montrant les unités libres et complexées (Adapté de Y. Bourne, P. Rougé et C. Cambillau, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, p. 197).

La figure 14.5.a donne la disposition relative de chaque sous-unité de la lectine, des deux molécules d'octasaccharide et des deux paires Ca^{++} , Mn^{++} . Les sucres sont voisins des extrémités du grand axe de l'édifice. En 14.5.b, on a représenté plus en détail la disposition du sucre au voisinage de la lectine. La complexation change peu la configuration de celle-ci, sauf qu'une boucle peptidique, 208-211 se rapproche de 0,8 Å de Man-4. Ce mannose occupe une poche localisée près de Ca^{++} , dite « le site de liaison du monosaccharide ».

L'octasaccharide complexé à la forme d'un S étiré (Fig. 14.6). Cinq des angles dièdres θ et φ (voir le paragraphe 10.2) correspondent à des minimum d'énergie selon les idées reçues sur l'effet exoanomérique. La liaison α (1-3) entre Man-3 et Man-4 correspond à un maximum^[8]. Dans le complexe du fragment plus simple 234, la conformation est très différente, ce qui montre qu'un petit fragment n'est pas nécessairement un bon modèle^[8].

La complexation est assurée par une multiplicité de liaisons polaires (< 3 Å). Il y a 14 liaisons hydrogène directes entre les oxygènes ou azotes du sucre et les groupements polaires des résidus acides aminés et 7 réalisées par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. De plus, 14 molécules d'eau sont impliquées dans des

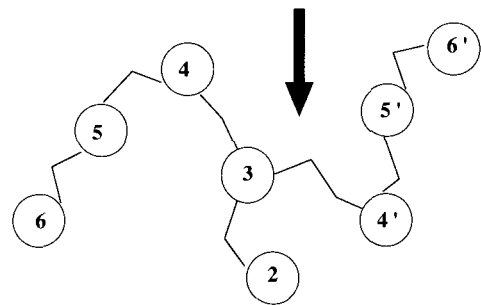


Figure 14.6 Représentation schématique de l’octosaccharide complexé. Adapté de A. Imberty, M. M. Delage, Y. Bourne, C. Cambillau et S. Perez, *Glycoconj. J.*, 8 (1991) 456-483. La flèche indique l’emplacement du phényle enserré comme par une pince par entre Man-4 et GlcNAc-5’.

contacts indirects, entre le sucre et la lectine, ou entre les unités consécutives du sucre (Tableau 14.2). Dans ce dernier cas le résultat est une stabilisation de la conformation. A ceci contribuent en plus 18 liaisons hydrogène, dont une directe et 17 indirectes. En raison de la spécificité élevée des lectines, on doit s’attendre à ce que la complexation fasse intervenir les liaisons hydrogène, qui ont un carac-

<i>Liaisons directes</i>			<i>Liaisons directes</i>		
Man 4	0(3)	Gly-99	GlcNAc 5	0(5)	Asn-39
	0(4)	Asp-81		0(5)	Ala-209
	0(4)	Gly-99	GlcNAc 5'	0(6)	Tyr-124
	0(5)	Asn-125		0(3)	Tyr-77
	0(6)	Asp-81	Gal-6'	N(2)	Glu-210
	0(6)	Gly-208		0(2)	Tyr 77
	0(6)	Ala-209			
		Glu-210			
<i>Liaisons par l'intermédiaire d'une molécule d'eau</i>					
Glc NAc 5	N(2)	Asn 39			
		Gly-98			
Glc NAc 5'	0(4)	Tyr-77			
		Val-79			
		Thre-122			
		Arg-135			
Gal-6'	0(5)	Tyr-124			

Tableau 14.2 Description sommaire des liaisons hydrogène entre l’octasaccharide et la lectine de *Lathyrus Ochrus*.

tère directif. La nouveauté importante dans cette détermination de structure est l'observation de la participation massive de molécules d'eau à la complexation.

Le complexe est également stabilisé par 68 contacts de Van der Waals ($< 4 \text{ \AA}$), dont 27 avec des résidus aromatiques. On observe principalement ces contacts entre les cycles aromatiques et les atomes C(5) – C(6) des sucres. Les unités Man-4 et GlcNAc-5' interagissent de part et d'autre des deux faces du cycle phényle de Phe-123, qu'elles enserrant comme une pince (Fig. 14.6). Les deux unités qui les séparent, Man-3 et Man-4', sont exposées au solvant. De même, GlcNAc-2 et Gal-6 sont complètement exposés au solvant. Ceci apparaît plus clairement à la figure 14.5.b.

RÉFÉRENCES

- [1] F. A. Quiocho, *Annu. Rev. Biochem.*, 55 (1985) 287-315.
- [2] F. A. Quiocho, *Pure Appl. Chem.*, 61 (1989) 1293-1306.
- [3] G. A. Jeffrey et M. Sundaralingam, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 38 (1981) 417-529.
- [4] J. C. Spurlino, G. Y. Lu et F. A. Quiocho, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 5202-5219.
- [5] A. J. Sharff, L. R. Rodseth, J. C. Spurlino et F. A. Quiocho, *Biochemistry*, 31 (1992) 10657-10663.
- [6] Y. Bourne, P. Rougé et C. Cambillau, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 197-203.
- [7] Y. Bourne, P. Rougé et C. Cambillau, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 18161-18165.
- [8] A. Imberty, M. M. Delage, Y. Bourne, C. Cambillau et S. Perez, *Glycoconj. J.*, 8 (1991) 456-483.

Antigènes et anticorps. Lectines

15.1 AVERTISSEMENT

Les lecteurs qui ont reçu une formation biochimique ou médicale reconnaîtront de suite que les paragraphes 15.2 et 15.3 ne se situent pas au même niveau que les autres exposés de ce livre. Cet exposé sommaire de l'immunochimie est destiné avant tout aux lecteurs qui ont suivi le cursus traditionnel en chimie organique. Actuellement une forte proportion des chimistes travaillant sur les sucres ont des relations plus ou moins étroites avec des groupes d'immunologistes. Dans cet ouvrage même, des termes tels que antigène, anticorps, anticorps monoclonal, déterminant, épitope, etc., se rencontrent en différents paragraphes ; il est fait également référence à certaines méthodes analytiques de l'immunologie quantitative. La lecture des paragraphes 15.2 et 15.3 doit donner au chimiste organicien une vision plus concrète de ces notions et de ces expériences. On espère ainsi faciliter le dialogue avec les immunologistes.

15.2 ANTIGÈNES ET ANTICORPS

L'introduction d'une macromolécule étrangère dans la circulation sanguine d'un vertébré supérieur (souris, lapin, cobaye, mouton, chèvre...) peut éventuellement susciter l'apparition dans le sérum d'une collection de protéines particulières. C'est le plus souvent un mélange hétérogène de molécules douées d'une propriété commune : elles se combinent de façon non covalente à la macromolécule qui a entraîné leur apparition. On dit alors que cette macromolécule s'est comportée comme un *antigène dans les circonstances exactes de l'expérience* et les protéines réactives apparues dans le sérum s'appellent *anticorps*. Il faut préciser le protocole de l'injection — molécule homogène, ou liée à un support macromoléculaire, ou solidaire d'une paroi cellulaire — et l'animal injecté — lapin, souris, etc. — car une même molécule peut être antigénique ou non suivant les conditions de son administration.

L'étude de la structure des anticorps a été possible grâce à une technique, décrite plus loin dans ce chapitre, qui a permis d'obtenir des protéines homogènes. Ces protéines appartiennent à la famille générale des globulines, les *immunoglobulines* I_g . Elles se répartissent en classe et sous-classes sur lesquelles nous reviendrons.

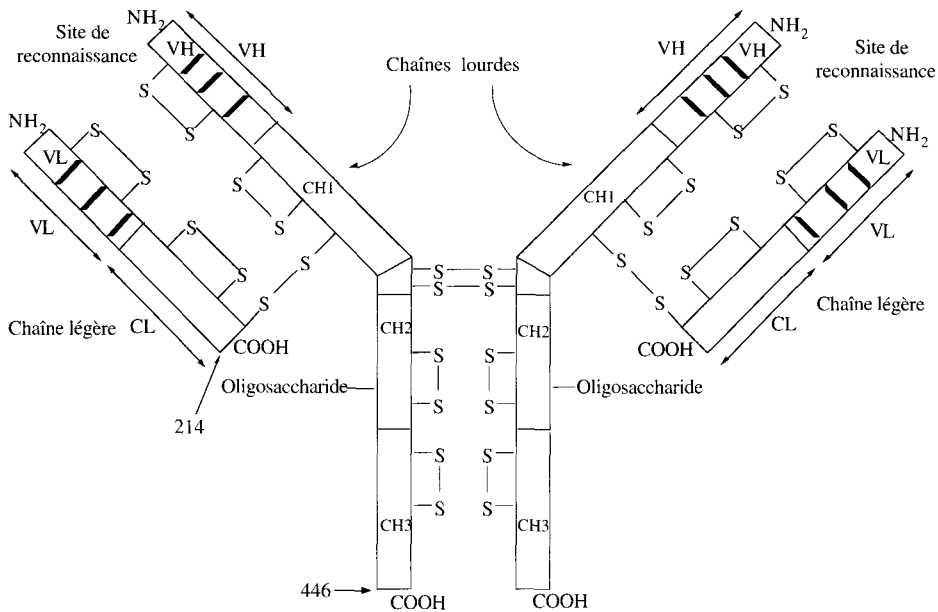


Figure 15.1 Représentation schématique d'une immunoglobuline.

Elles sont toutes bâties selon le même plan général, donné à la figure 15.1 dans le cas particulier d'une « Ig A ». Il y a deux sous-unités identiques reliées par des ponts disulfure. Chaque sous-unité comprend deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure, une chaîne dite lourde H ($M \approx 50\,000$) et une chaîne dite légère L ($M \approx 23\,000$). Il y a deux domaines dans la chaîne légère. Un domaine variable VL, dont la séquence varie en fonction de la spécificité antigénique de l'immunoglobuline, s'étend sur environ la moitié de la chaîne, du côté « amino ». L'autre domaine, du côté « carboxylique » CL, est constant. Au sein du domaine variable VL, on rencontre des régions « hypervariables » représentées par des traits noirs. Ces régions hypervariables sont dans les boucles qui relient les plis β . La conformation particulière du polypeptide dans le domaine variable a pour effet de ramener ces régions hypervariables au voisinage les unes des autres et à une extrémité de l'édifice. De même, la chaîne lourde comporte un domaine variable VH avec des régions hypervariables rejetées vers l'extrémité, qui s'étend sur le quart de sa longueur, puis un premier domaine constant CH1 jusqu'à une région charnière qui contient deux ponts disulfure qui la relie à l'autre chaîne lourde. Il y a ensuite deux autres domaines constants CH2 et CH3. A ce niveau se trouve un oligosaccharide. Une protéolyse limitée au voisinage de la charnière sépare deux fragments identiques appelés Fab, composés chacun d'une chaîne L et des domaines VH et CH1 de la chaîne H. Ce fragment Fab

conserve les propriétés d'association avec les antigènes. L'autre moitié de la chaîne H, appelée Fc, est la partie responsable de certaines propriétés immunologiques de l'immunoglobuline, autres que la combinaison directe avec l'antigène.

Ce sont les régions hypervariables des chaînes L et H, voisines les unes des autres dans les immunoglobulines qui constituent le site d'interaction — le site de reconnaissance — de l'antigène par l'anticorps. On voit qu'il y a deux sites de reconnaissance dans l'immunoglobuline de la figure 15.1. Il y a cinq classes de chaînes H, μ , δ , γ , ϵ et α , auxquelles correspondent cinq classes d'immunoglobulines, IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Il y a deux types de chaînes légères, κ et λ . Certaines immunoglobulines sont circulantes ; certaines jouent le rôle de récepteur à la surface de certaines cellules sanguines ; ou présentent ces deux comportements.

L'adaptation de l'anticorps à l'antigène est parfois d'une très grande finesse, ce qui peut laisser perplexe, car l'animal immunisé s'est trouvé confronté à des molécules qui lui étaient totalement étrangères et, même parfois, à des substances organiques sans aucun rapport avec le monde vivant. Tout se passe comme s'il s'était agi pour lui d'un costume coupé par un excellent tailleur mais ce n'est qu'une illusion, car le costume est un costume de confection, acheté dans un magasin où il y a en stock 10^8 patrons différents et où il est procédé ultérieurement à des retouches. Nous allons décrire sommairement le mécanisme. Les cellules responsables de la fabrication des anticorps anti-sucres, auxquels nous nous intéressons principalement sont les lymphocytes B. Il y a au moins 10^8 clones de lymphocytes B, c'est-à-dire de populations, chacune très restreinte, issues d'une seule cellule mère. Les cellules d'un clone déterminé, qui sont toutes identiques, fabriquent et expriment à leur surface une immunoglobuline caractéristique. Les cellules d'un autre clone fabriquent une immunoglobuline différente. Il y a donc autant d'immunoglobulines que de clones distincts, soit environ 10^8 . L'antigène se fixe sur les sites récepteurs des Ig pour lesquels il a la plus grande affinité. Cette fixation déclenche la prolifération des lymphocytes porteurs de ces immunoglobulines reconnues, et l'expansion du clone bien au-delà de ses dimensions primitives. Les lymphocytes B ainsi activés se différencient en plasmocytes, qui sécrètent dans le sérum l'immunoglobuline complémentaire de l'antigène, et en cellules à mémoire. Enfin, un taux de mutation élevé de ces cellules a pour conséquence une amélioration constante de la finesse de l'adaptation antigène-anticorps. Ce sont les « retouches » dont nous laisserons de côté le mécanisme.

Dans ces conditions, on comprendra aisément l'hétérogénéité des anticorps. Sur les 10^8 molécules d'immunoglobulines entre lesquelles l'antigène doit faire un choix, il y en aura en général plus d'une dont la complémentarité à l'antigène sera suffisante pour déclencher la prolifération du lymphocyte porteur. Aussi le sérum de l'animal immunisé contient-il un mélange d'anticorps issus de clones différents, que l'on appelle un *anticorps polyclonal*. Ses propriétés varient avec le temps et le calendrier des injections. Il peut y avoir encore une autre source d'hétérogénéité, c'est la présence de plusieurs sites antigéniques chimiquement diffé-

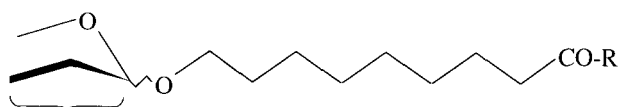
rents sur la molécule d'antigène. Plusieurs techniques très fines démontrent l'hétérogénéité de l'anticorps polyclonal, mais la séparation des constituants monoclonaux en quantité suffisante pour étudier leurs propriétés n'est pas praticable. La préparation des anticorps monoclonaux repose sur un autre principe. Le lecteur reconnaîtra au passage que, comme dans toutes les autres branches, plus traditionnelles, de la chimie, l'obtention de composés purs est source de progrès considérables. Nous avons vu que l'immunisation avec un antigène Ag amène la prolifération de clones de lymphocytes B, chacun spécialisé dans la production de l'un des anticorps anti-Ag, soient X, X', X'', etc. Si l'on pouvait cultiver ces cellules *in vitro*, des méthodes éprouvées permettraient de séparer ces clones. Malheureusement il n'est pas possible de cultiver les lymphocytes B *in vitro*. On a tourné la difficulté en utilisant les propriétés d'une lignée de cellules myélomateuses. Le myélome multiple est une maladie qui résulte de la transformation maligne d'un clone unique de plasmocytes, dont la prolifération s'effectue essentiellement dans la moelle osseuse. Ces cellules synthétisent et excrètent une immunoglobuline monoclonale. On peut les propager indéfiniment par culture. En les fusionnant avec les cellules de la population de lymphocytes activés par l'antigène, on obtient les *hybridomes*, des cellules hybrides, cultivables *in vitro*, et exprimant l'une des immunoglobulines X, X', X'',... Les étapes successives de la préparation de l'anticorps monoclonal X à l'état pur sont les suivantes. On immunise des souris avec l'antigène. On recueille les lymphocytes B en prélevant la rate de l'animal et on les mélange avec les cellules myélomateuses dans une solution aqueuse à 50 % de polyéthylèneglycol, pH 8,0. Après quelques heures, on a un mélange d'hybridomes avec les deux types de cellules d'origine. Les cellules de la rate non hybridées meurent en un ou deux jours. Quant aux cellules myélomateuses, elles ont été génétiquement programmées pour qu'on puisse les tuer sélectivement. Ne restent que les hybridomes exprimant les immunoglobulines X, X', X'',... Il faut vérifier à cette étape que ces cellules sont effectivement productrices d'anticorps. La dernière étape est le clonage, technique qui permet de préparer des cultures homogènes, issues chacune d'une seule cellule et exprimant chacune un anticorps monoclonal déterminé.

15.3 LA RÉACTION IMMUNOCHIMIQUE IN VITRO

Le lecteur aura compris en lisant le paragraphe précédent que l'immunisation d'un animal pour obtenir un anticorps polyclonal et la séparation de ses constituants en unités monoclonales homogènes font appel à des techniques apparentées à la biologie. En revanche, l'étude de l'association entre antigène et anticorps chimiquement définis *in vitro* est typiquement une branche de la chimie, science dont le domaine doit recouvrir toute espèce de combinaisons, même si elles n'impliquent pas de liaisons covalentes. Sauf indication contraire, il ne sera plus question dans la suite que d'anticorps monoclonaux.

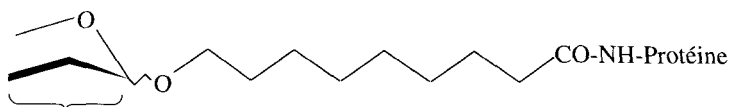
15.3.1 Haptènes

Nous avons décrit en termes généraux, au paragraphe 15.1, le site récepteur des immunoglobulines, constitué par le rapprochement des boucles hypervariables à l'extrémité des chaînes L et H. Nous allons maintenant nous préoccuper du site complémentaire sur les antigènes. Il peut y avoir plusieurs sites antigéniques chimiquement différents (ou de conformations stables différentes) sur une même molécule d'antigène et on retrouvera alors les anticorps correspondants mélangés dans l'antisérum. On arrive éventuellement à reconnaître la nature chimique des sites dans certains cas. Cette séquence particulière de l'antigène s'appelle un *déterminant antigénique*, nom quelques fois remplacé dans les textes modernes par *épitope*. Il peut arriver que cet épitope soit un résidu oligosaccharidique et que l'oligosaccharide libre correspondant soit disponible par ailleurs, à partir d'une source naturelle ou par synthèse. Cette petite molécule, ajoutée à une solution de l'anticorps monoclonal suscité contre la grosse molécule de l'antigène, se combine réversiblement à cet anticorps. Il y a plusieurs démonstrations de cette association, dont l'une repose sur les expériences d'inhibition décrites plus loin. Cependant elle n'est pas antigénique et ne suscite pas la formation d'un anticorps quand elle est introduite dans la circulation sanguine. Pour être antigénique, une molécule doit avoir une masse moléculaire d'au moins 3000 D et de préférence supérieure à 10 000 D. Il arrive qu'on puisse tourner la difficulté en attachant l'oligosaccharide de façon covalente à une macromolécule transporteuse, le plus souvent une protéine, par exemple la sérumalbumine bovine. L'attachement a lieu en utilisant les fonctions des chaînes latérales des résidus acides aminés de la chaîne peptidique, presque toujours les fonctions aminées. Il est évident que le problème a un grand nombre de solutions. L'une d'entre elles consiste à préparer un glycoside **15.1** de l'ester méthylique de l'acide 9-hydroxynonanoïque qui est transformé en azoture d'acyle **15.2** par des traitements successifs classiques par l'hydrazine et l'acide nitreux. Ces dérivés réagissent sur les amines primaires pour donner une amide et, de cette façon l'oligosaccharide est fixé selon le schéma par-



15.1 R=OMe

15.2 R=N₃



15.3

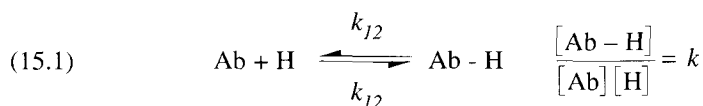
tiel **15.3**. Naturellement, il y a beaucoup de chaînes latérales aminées dans la sérumalbumine bovine, donc beaucoup de molécules d'oligosaccharide fixé. Il y aura ainsi plusieurs épitopes d'un même anticorps. L'antigène est dit multivalent.

Cette petite molécule couplée à un support macromoléculaire pour susciter la formation d'un anticorps s'appelle un *haptène*. La technique de fixation du haptène sur un transporteur macromoléculaire a permis la préparation d'anticorps dirigés contre un grand nombre de structures chimiques, certaines totalement étrangères à l'économie du monde vivant. Un inconvénient de cette technique, c'est qu'elle suscite également la formation d'anticorps dirigés contre la molécule transporteuse et parfois l'ancre d'accrochage.

15.3.2 Physicochimie de la réaction immunochimique

Les forces de la liaison impliquées sont des attractions électrostatiques entre sites chargés, comme un site -NH_3^+ porté par la lysine et un carboxylate, des forces de Van der Waals et des liaisons hydrogène. On prévoit que les deux premiers types de force, qui augmentent rapidement quand la distance diminue, seront d'autant plus efficaces que meilleure sera la complémentarité. On parle aussi d'interactions hydrophobes, du fait qu'une exacte complémentarité chasse les molécules d'eau entre les sites correspondants. Ces interactions pourraient se manifester entre les résidus « hydrophobes », valine, leucine, phénylalanine, etc. Cette notion, développée au chapitre 11, sous-entend que la diminution de l'aire de contact de ces résidus avec l'eau est en elle-même un facteur favorable. Toutes ces interactions sont réversibles : si on introduit un complexe haptène-anticorps en solution dans un sac à dialyse, le haptène peut seul diffuser à travers la paroi et son élimination de la solution intérieure au sac entraîne la dissociation complète par déplacement de l'équilibre.

La réaction d'un site de l'anticorps Ab avec une molécule de haptène H (ou de l'antigène monovalent de même spécificité) est équilibrée, avec une constante k fonction de la température (15.1) et il lui correspond une variation d'enthalpie libre donnée par (15.2)



$$(15.2) \quad \Delta G^\circ = -RT \log k$$

La vitesse de l'association est toujours très grande, $k_{12} = 10^6 - 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comme il y a un large éventail de constantes d'équilibre k , égales à k_{12}/k_{21} , il y a un étalement comparable des valeurs de k_{21} .

En fait la situation est loin d'être aussi simple : il y a deux sites de combinaison à l'antigène sur les immunoglobulines IgG, IgD et IgE, mais pour les deux autres, il peut y avoir association de plusieurs unités fondamentales Ig analogues à celle qui est esquissée à la figure 15.1, si bien qu'il y a dix sites de combinaison

à l'antigène sur les IgM et deux ou quatre sur les IgA. On dit que ces anticorps sont déca-, di- ou tétravalents. Les antigènes et les conjugués hapténiques peuvent aussi être multivalents. Par exemple, sur un antigène artificiel préparé par couplage d'un haptène avec une protéine, il peut y avoir un site de combinaison lié à chaque résidu lysine de la molécule porteuse. Les polysaccharides bactériens, dont l'étude est une branche importante de l'immunochimie, sont constitués d'unités oligosaccharidiques répétitives. Il peut y avoir jusqu'à 40 sites de combinaison. La réaction entre antigène et anticorps multivalents est donc très compliquée et donne des produits de composition continûment variable en fonction des proportions de réactif. Elle est non stœchiométrique. Les formules (15.3) et (15.4) n'ont pas un sens physicochimique rigoureux, mais décrivent approximativement une moyenne de sous-réactions.



$$(15.4) \quad \Delta G^\circ = -RT \log k$$

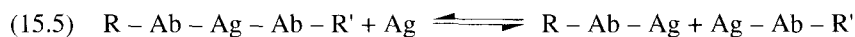
On peut toujours calculer un chiffre k , à partir des concentrations mesurables $[\text{Ag}-\text{Ab}]$ de l'antigène libre et combiné. Ces valeurs de k , comprises entre 10^3 et 10^{11} mol^{-1} , sont une mesure pratique de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Dans ces situations de liaisons multiples on emploie à la place d'affinité le mot « avidité », pour mieux souligner le caractère empirique des mesures. La multivalence de l'anticorps et de l'antigène entraîne une augmentation notable de k . On peut le comprendre qualitativement : la rupture d'une liaison sur un seul site ne rompt pas l'association, puisqu'il y a encore des liaisons en d'autres sites d'accrochage. On calcule que ΔG° varie de -6 à -11 kcal mol⁻¹ et ΔH° , de -4 à -13 kcal mol⁻¹. L'entropie d'association est presque toujours positive.

Même un épitope parfaitement défini sur une molécule d'antigène entraîne la formation de plusieurs anticorps monoclonaux, qui diffèrent les uns des autres par la structure du site de combinaison et l'affinité. C'est très compréhensible d'après le mécanisme de multiplication exposé au paragraphe 15.2. Ce qu'il faut noter maintenant, c'est que la spécificité de chacun de ces anticorps monoclonaux n'est pas rigoureuse. Elle est souvent élevée, mais on peut observer aussi l'association avec des molécules voisines. Dans ce cas-là, la constante d'association est plus faible. Par exemple, un épitope oligosaccharidique peut correspondre à un enchaînement de six résidus monosaccharidiques (hexasaccharide). Avec l'antigène monoclonal spécifique de cet enchaînement, on observera encore des associations, avec constantes d'affinités rapidement décroissantes, des pentasaccharides, tétrasaccharides, etc. obtenus en élaguant un, deux résidus monosaccharidiques, etc. à partir d'une extrémité de l'hexasaccharide. Par ailleurs, si la suppression, par exemple, d'un hydroxyle, en un point déterminé d'un oligosaccharide par une méthode chimique, change peu — ou ne change pas du tout — l'association avec l'anticorps correspondant, on en conclut qu'il ne participe pas à la liaison. Comme l'anticorps ne « voit » que le nuage électronique frontière du haptène, on peut imaginer des répartitions d'atomes et donc une molécule radicalement différents

auxquels cet anticorps s'associera tout aussi bien qu'avec le haptène, parce qu'ils offrent une frontière approximativement identique à la combinaison. Il y a des exemples, mais cet aspect n'a pas été étudié systématiquement. On a mis à profit l'existence de ces *réactions croisées* dans la technique des anticorps catalytiques. L'idée fondamentale est de stabiliser l'état de transition d'une réaction, donc d'abaisser son énergie d'activation, en l'associant à un anticorps spécifique. Naturellement il est impossible de manipuler comme un haptène un édifice hautement instable comme un état de transition. On le remplace donc par une molécule stable, dont l'extérieur est aussi voisin que possible de la périphérie (supposée !) de l'état de transition. Les anticorps ainsi préparés accélèrent les réactions et fonctionnent comme des enzymes. On a forgé pour ces immunoglobulines le nom d'*abzyme*. On en a préparé une cinquantaine à ce jour.

La réaction de précipitation

Les chimistes organiciens connaissent bien les réactions de polycondensation entre molécules bifonctionnelles et molécules au moins trifonctionnelles, par exemple entre l'anhydride phtalique et la glycérine. Il se forme alors un réseau tridimensionnel. C'est la même situation lorsqu'on oppose un antigène multivalent à une immunoglobuline, il se produit un enchevêtrement de macromolécules qui devient rapidement insoluble dans l'eau. Cependant, il y a une différence notable avec la polycondensation industrielle, c'est que l'association est réversible dans les conditions de la réaction. Supposons qu'on ajoute progressivement l'antigène à l'anticorps en solution aqueuse. Au début, il y a un excès d'anticorps et les associations peuvent être symbolisées par Ab-Ag , AbAg_2 , puis l'addition du réactif polyfonctionnel Ag entraîne une réticulation et il se produit un précipité. Celui-ci augmente graduellement, tout en changeant de composition, s'il est en équilibre avec la solution, jusqu'à la composition « stœchiométrique » où tous les sites de combinaison de l'antigène et de l'anticorps sont utilisés. Si l'on poursuit l'addition d'antigène au-delà de ce stade, on observe la dissolution progressive du précipité. C'est une conséquence de la réversibilité de l'association : la réaction (15.5) indique comment un excès d'antigène produit la rupture de l'association de deux molécules d'anticorps liées par l'intermédiaire d'une molécule d'antigène au moins divalent.



On progresse jusqu'à la dépolymérisation complète et la redissolution. En accord avec ce mécanisme, on n'observe pas de précipitation avec les antigènes monovalents, ni avec certaines immunoglobulines, qui sont devenues monovalentes à la suite du blocage interne de l'un des deux sites actifs par une séquence oligosaccharidique attachée de façon covalente à leur chaîne polypeptidique.

La réaction d'agglutination

Nous nous retrouvons ici à la limite de la biologie, mais cette réaction doit être citée à cause de son extrême sensibilité. Les molécules antigéniques peuvent par-

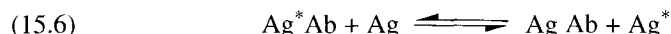
fois s'exprimer naturellement, avec une densité particulièrement élevée sur les érythrocytes. Ainsi il y a 10^6 déterminants A de groupe sanguin sur la surface des hématies A₁. Ces cellules donnent des suspensions modérément stables, et ne se sédimentent que lentement. En présence d'anticorps anti-A, il y a réticulation en de nombreux points entre des molécules d'antigène solidaires de cellules différentes, ce qui provoque la formation d'agglomérats qui sédimentent rapidement. Les IgM décavalentes sont particulièrement efficaces.

Dosages d'anticorps et d'antigènes

Nous ne donnerons ici que les principes et le lecteur trouvera des exemples d'application dans les chapitres 16 et 17. La pesée directe du précipité centrifugé ou l'estimation de son poids par dosage de sa teneur en azote ne semblent pas adaptées aux recherches modernes, qui nécessitent de doser des μg d'antigène et d'anticorps. Cependant on a pu élaborer une mesure fondée sur la précipitation.

Le dosage d'un anticorps en milieu liquide utilise l'antigène spécifique marqué par un traceur, maintenant généralement ^{125}I , Ag*, ajouté en excès. La combinaison Ag*Ab, soluble dans ces conditions, est séparée par précipitation, par le sulfate d'ammonium à 50 % ou par un anticorps anti-Ig général. On mesure la radioactivité du précipité.

Pour doser l'antigène, on commence de la même façon par faire la combinaison Ag*Ab en solution avec un excès d'Ag*. On ajoute la solution de Ag à doser, d'où l'équilibre (15.6).



On mesure le rapport de la radioactivité liée à la radioactivité libre et on fait une courbe d'étalonnage pour une série de concentrations de l'antigène Ag. Cette technique se prête aussi à la comparaison de l'affinité d'une série de petites molécules H pour le récepteur antigénique sur l'anticorps. Celles-ci déplacent partiellement l'antigène de la combinaison (15.7).



L'affinité de H pour le site de combinaison de l'antigène sur l'anticorps Ab sera caractérisée, par exemple, par la molarité nécessaire pour observer 50 % d'inhibition de la combinaison « authentique » AgAb. On peut aussi présenter le résultat plus complètement comme la courbe donnant le % d'inhibition en fonction de la molarité de H. Il faut souligner que, pour ces essais, le chimiste doit donner à l'immunochimiste des échantillons ayant le maximum de pureté possible, car l'affinité peut varier de un à mille dans une série, c'est-à-dire que un millième d'un analogue très actif dans un composé moins actif fausse complètement les conclusions. On fait maintenant beaucoup d'analyses en phase solide. Par exemple, l'antigène est adsorbé à la surface de cupules de plastique et, après l'addition de la solution d'anticorps, un lavage sépare l'anticorps lié de l'anticorps libre.

15.4 LES LECTINES : DÉFINITIONS, EXTRACTION

Initialement, on a donné le nom de *lectines*^{[1][2]} à des protéines, ou glycoprotéines, presque exclusivement extraites des graines végétales pouvant s'associer réversiblement à des molécules de sucre. On a aussi dès le début classé avec les lectines certaines préparations faites à partir de fluides animaux, provenant par exemple de l'anguille, de l'escargot comestible ou de la limace. Puis le terme s'est étendu à toute une série de protéines ayant de l'affinité pour les sucres, ayant les origines les plus diverses. Par exemple, il y a dans le sérum de lapin une glycoprotéine, la céruloplasmine, dont les chaînes oligosaccharidiques se terminent par un résidu sialique, en position terminale non réductrice, porté par un résidu galactose pénultième. La désialylation de cette glycoprotéine entraîne sa rapide absorption par les cellules hépatiques. Ceci est dû à la présence dans ces cellules d'une lectine qui retient les molécules possédant un résidu galactose en position terminale non réductrice. Ces « lectines » animales sont assez nombreuses et ont probablement des fonctions biologiques importantes. On trouve aussi des protéines capables de lier réversiblement les sucres chez les bactéries et les moisissures. Donc, le terme de lectine recouvre une catégorie plus étendue qu'au début, cependant on exclue de cette catégorie les enzymes de métabolisme des sucres, les anticorps anti-sucres et les protéines de transport des sucres. Nous ne décrirons dans ce chapitre que les lectines traditionnelles. On trouvera des exemples de lectines animales, les sélectines, au paragraphe 17.6.

Presque toutes les méthodes actuelles d'isolement et de purification des lectines reposent sur la chromatographie d'affinité. Bien sûr, il faut déterminer à l'avance le ligand caractéristique. On peut utiliser la propriété des lectines de précipiter certaines macromolécules et d'agglutiner certains types de cellules, animales ou végétales. Le moteur de la réaction est l'association avec certains résidus, généralement monosaccharidiques, solidaires de la macromolécule ou de la périphérie cellulaire. Lorsqu'une activité de ce type a été reconnue, on recherche quel est le sucre qui peut l'inhiber à la concentration molaire la plus basse possible. Comme dans le cas des précipitations immunochimiques, cette inhibition est due à l'occupation du site de reconnaissance par la petite molécule soluble.

Une fois le ligand le plus efficace découvert, on l'attache par une liaison covalente stable à une macromolécule insoluble et inerte et on monte une colonne chromatographique avec ce matériau. Dans certains cas, on peut remplir directement les colonnes avec des absorbants commerciaux qui contiennent la structure du ligand. Le « Sephadex », à base de dextrane, polysaccharide à résidus α -glucopyranosyle retient les lectines spécifiques de cette configuration. On peut aussi employer directement la chitine, polysaccharide insoluble à résidus β -N-acétylglucosamine, ou l'agarose. Parmi les supports utilisés pour fabriquer des conjugués, notons l'agarose (sépharose), la polyacrylamide (BioGel P) et l'amidon.

Pour isoler une lectine végétale, on moule les graines en farine très fine, que l'on traite d'abord par des solvants organiques (méthanol, éther) pour enlever les matières grasses. On extrait ensuite les protéines par des solutions salines ou des

tampons et on concentre la lectine par les opérations habituelles de précipitation au sulfate d'ammonium, redissolution, etc. Pour la purification finale, on fait percoler la solution de lectine à travers la colonne d'affinité. La lectine est retenue sur le remplissage par son association avec le ligand combiné solidaire de ce remplissage. Après lavage de la colonne, on décroche la lectine par élution avec une solution du même ligand soluble, qui déplace l'équilibre d'association. Un certain nombre de lectines, extraites de graines peu coûteuses par des opérations simples, sont d'un accès très facile. Par exemple, on a pu isoler 3 g de la lectine « Concanavaline A » à partir de 100 g de farine de fève Jack. Cette facilité d'accès aux lectines, jointe à la multiplicité de leurs propriétés a eu comme conséquence une énorme littérature.

Il ne semble pas possible de fonder une nomenclature des lectines sur la structure. La nomenclature proposée par Goldstein^[1] associe l'origine botanique aux configurations reconnues classées par affinités décroissantes. Par exemple :

- Lectine de *Canavalia ensiformis* (α -D-Man p > α -D-Glcp > α -D-GlcNAcp),
- Lectine de *Triticum vulgaris* (β -D-GlcNAcp-(1→4)- β -D-GlcNAcp - (1→4)-D-GlcNAc > β -D-GlcNAcp-(1→4)-D-GlcNAc » β -D-GlcNAcp).

Il s'agit respectivement de la lectine de la fève Jack et de celle du germe de blé. Malheureusement cette nomenclature dépend du raffinement expérimental. Comparez le nom de la lectine de la fève Jack donné ici (1978) et celui du paragraphe 15.5.3 (1986).

15.4.1 Structure

On prendra comme exemple la Concanavaline A, abondante dans la farine de la fève Jack. La purification finale utilise l'absorption sur une colonne de Sephadex, dont la lectine est désorbée par une solution de glucose. La Concanavaline A est formée de quatre sous-unités, M 26 500 daltons, associées en dimères au-dessous du pH 5.6 et en tétramères au-dessus. Chaque sous-unité contient un ion Mn^{2+} , un ion Ca^{2+} et un site de liaison au sucre. La figure 15.2 indique leur mode d'association, avec l'emplacement des ions et du site de combinaison. Une partie très importante des chaînes polypeptidiques existe sous la forme de plis β . C'est par ces régions que s'effectue l'association entre monomères.

On peut enlever les ions minéraux par traitement avec HCl 0.1 N, suivi de dialyse contre de l'eau distillée. Cette élimination abolit l'activité. On a identifié le site de combinaison par examen aux rayons X du complexe cristallisé avec le méthyle α -D-mannopyranoside. Il se situe à 7 Å et 11 Å, respectivement, des ions Ca^{2+} et Mn^{2+} . Les résidus d'acides aminés les plus voisins semblent être deux tyrosines, deux acides aspartiques, une asparagine, une leucine, une sérine et une arginine. Cette énumération semble indiquer une cavité nettement hydrophile. En fait, on observe que la fixation du ligand dissimule deux carboxyles par sous-unité vis-à-vis d'un certain nombre de réactifs, par exemple dans le titrage acidimé-

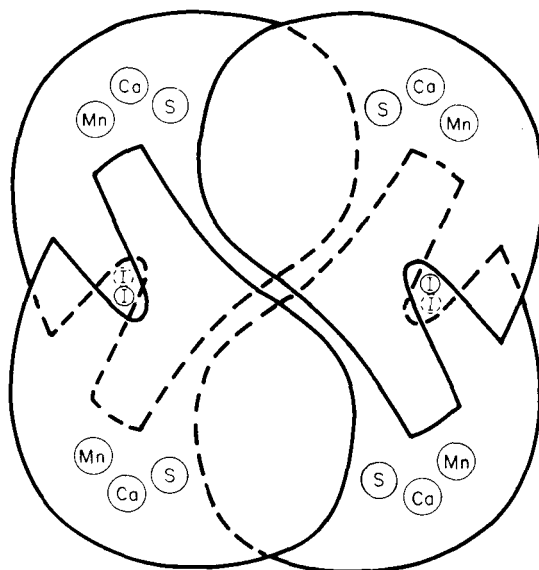
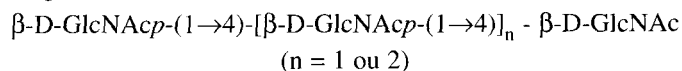


Figure 15.2 Représentation schématique du tétramère de la Concanavalline A. Les sites des ions Mn^{++} et Ca^{++} et le site d'association du sucre sont désignés respectivement^[6] par Mn, Ca et S. Extrait de J. W. Beeler, G. N. Reeke Jr., B. A. Cunningham et G. M. Edelman, *Nature*, 259 (1976) 406-409 (publié avec les aimables autorisations de *Nature* et des auteurs ; © 1976 Macmillan Magazines Limited ; nous remercions le Dr Edelman pour sa coopération).

trique. Les carboxyles en question pourraient être ceux des résidus aspartiques voisins du site de combinaison.

Examinons maintenant les autres lectines. On observe fréquemment la présence d'*isolectines*. Ce sont des molécules légèrement différentes, mais avec les mêmes propriétés d'association, que l'on isole simultanément à partir d'une source naturelle déterminée. Ainsi la séparation chromatographique des protéines à activité agglutinante du germe de blé (250-500 mg/kg) montre que cette activité est répartie sur quatre fractions dont les compositions en acides aminés sont presque identiques. Par ailleurs, ni les lectines du germe de blé ni la Concanavalline A ne sont liées de façon covalente à des sucres, alors que beaucoup d'autres lectines sont des glycoprotéines. Il leur arrive de présenter une proportion très élevée de sucres. Par exemple, on extrait de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) une lectine (38 mg pour 4,5 kg de tubercules) qui est spécifique des oligosaccharides liés à la chitine :



Cette lectine est une glycoprotéine, qui contient environ 50 % de son poids de sucre.

Comme la Concanavalline A, la grande majorité des lectines sont des associations de sous-unités. Elles sont parfois identiques, parfois différentes, souvent au nombre de quatre, mais parfois plus ou moins (deux). Ainsi chacune des deux isolectines de la lentille (*Lens culinaris* syn. *esculenta*) est décomposée en quatre sous-unités en milieu acide ou dans l'urée 8M. Il y a des chaînes « lourdes » H (M 17570D) et « légères » (M 5710 D). Chacune des deux isolectines se présente comme une association par liaison non covalente de deux chaînes H et deux chaînes L, conduisant à une masse molaire voisine de 46 000 D. Les lectines du germe de blé sont des dimères d'unités (M 21 600) dissociables par les dénaturants ou en conditions de pH extrêmes. Par contre, les sous-unités de la lectine des graines de ricin (*Ricinus communis*) sont associées de façon covalente par des ponts disulfure et on doit utiliser un réducteur, comme le mercaptoéthanol, pour les séparer.

Enfin la présence d'ions Mn^{2+} et Ca^{2+} , indispensables à l'activité de la concanavalline A, a été reconnue dans un certain nombre d'autres lectines.

15.4.2 Spécificité

La spécificité des lectines s'exprime par des associations solubles avec des petites molécules de sucres, ou des oligosaccharides, par des réactions de précipitation avec des oligosaccharides et enfin par des réactions d'agglutination de cellules végétales ou animales. Les divers niveaux de spécificité sont apparents, par exemple avec les cellules sanguines. Certaines lectines les agglutinent toutes ; d'autres lectines sont spécifiques de l'espèce de l'animal et d'autres encore spécifiques de son groupe sanguin. On peut analyser de façon quantitative les associations qui ne conduisent pas une précipitation avec les sucres simples et leurs dérivés, et les oligosaccharides, par la méthode de dialyse à l'équilibre. La solution de ligand est versée dans les deux compartiments séparés par la membrane et la lectine est ajoutée d'un côté seulement. A l'équilibre, la concentration en ligand libre est la même dans les deux compartiments et on la mesure commodément dans celui où il n'y a pas la lectine. Les constantes d'association varient de 10^2 à $10^5 M^{-1}$. Il est intéressant de comparer la constante d'association d'un ligand monosaccharidique, ou de son alkyl glycoside avec l'anomérisation convenable, avec celle d'un oligosaccharide où ce ligand occupe une position terminale non réductrice. La comparaison semble indiquer que le site de reconnaissance de la plupart des lectines correspond à un seul résidu glycosylé. Toutefois, avec plusieurs lectines, di- et tri-saccharides sont de meilleurs ligands que les monosaccharides, ce qui indique une interaction qui s'étend au-delà d'un seul résidu. Ainsi la Concanavalline A reconnaît essentiellement l' α -D-mannose, cependant les associations sont respectivement 4 et 20 fois plus fortes avec les di- et tri-saccharides α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man et α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man qu'avec le méthyle α -D-manno-pyranoside. Ce type d'enchaînement se rencontre dans les glycoprotéines. Dans presque tous les cas, dans les associations entre lectine et oligosaccharide ou glycoprotéine, l'association la plus importante du point

de vue de l'énergie de liaison a lieu avec le sucre terminal non réducteur. Plus rarement, elle a lieu avec résidus monosaccharides en ramification sur une chaîne principale. Par exemple, la Concanavaline A reconnaît les unités α -D-mannopyranosyl et α -D-glucopyranosyl terminales dans une chaîne oligosaccharidique, mais également les ramifications α -D-mannopyranosyl branchées en position 2 d'un sucre de la chaîne principale. Certaines lectines ne s'associent efficacement qu'à un anomère donné ; d'autres sont plus ou moins indifférentes à la configuration anomérique du résidu reconnu. La lectine de soja (*Glycine max*) reconnaît aussi bien les configurations α et β de la forme pyranosique de la *N*-acétylgalactosamine. Sa définition par ses ligands s'écrit : α -D-GalNAcp $\geq$ β -D-GalNAcp » α -D-Galp. Il y a cependant une légère préférence pour l'anomère α . De même, un certain nombre de lectines tolèrent des variations en position 2. On a remarqué ci-dessus que la Concanavaline A s'associe à la fois au D-mannose et au D-glucose. Un certain nombre de lectines reconnaissent à la fois le D-galactose et la *N*-acétylgalactosamine, quoiqu'avec une préférence marquée pour l'un ou l'autre de ces deux sucres. On l'aura remarqué, ci-dessus, à propos de la lectine du soja. En revanche, les lectines tolèrent très peu de variations sur les positions 3 et 4. Il n'y a pas de « réactions croisées » entre les configurations *D-gluco* et *D-galacto*, par exemple.

Le mélange en solution aqueuse d'une lectine avec un polysaccharide comportant des résidus reconnus par cette lectine entraîne en général une précipitation, tout comme le mélange d'une immunoglobuline avec l'antigène correspondant. La Concanavaline A précipite le dextrane, polysaccharide bâti à partir d'unités α -D-glucopyranose. Il est possible d'opérer quantitativement ; on ajoute des quantités croissantes de polysaccharide à des portions aliquotes de lectine, on centrifuge, on lave le précipité et on procède au dosage d'azote. On observe une courbe de précipitation tout à fait semblable à celle que l'on observerait dans une réaction antigène-anticorps (voir le paragraphe 15.3) : il y a trois zones : au départ, il y a excès de lectine et tout le dextrane est précipité. A l'équivalence, tout le dextrane et toute la lectine ont précipité. C'est à ce stade que l'on observe le maximum de précipitation. Un excès de dextrane solubilise le précipité qui disparaît.

15.4.3 Description abrégée de quelques lectines^[3]

Pour chaque lectine, on donne d'abord sa description selon la nomenclature préconisée. A la ligne suivante, on trouvera sa masse molaire et celle des sous-unités (α , β ...) ainsi que le mode d'association des sous-unités, le nombre *n* de sites actifs et les métaux éventuellement présents. On termine par la constante d'association avec un bon substrat.

Lectine de la fève Jack (Canavalia ensiformis)

α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man > α -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)-D-Man >
 α -D-Man > α -D-Glc > α -D-Glc NAc

M 106000 ; α : 26500 ; pH7 : α_4 ; pH5 : α_2 ; $n = 4$;
 Ca^{2+} , Mn^{2+} ;
 k_a $2,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (2°C) (méthyl α -D-mannopyranoside ; 3,6-di- O - α -D-mannosyl-D-mannose).

Lectines de Griffonia simplicifolia

Isolectine B₄ : α -D-Gal » α -GalNAc ; Isolectine A₄ : α -D-GalNAc » α -D-Gal

M 114000 ; α : 32000, β : 33000 ; cinq isolectines, A₄ (α_4), A₃B ($\alpha_3 \beta$), A₂ B₂ ($\alpha_2 \beta_2$), AB₃ ($\alpha \beta_3$) et B₄ (β_4) ; $n = 4$;
 Ca^{++} ;

Isolectine B₄ : K_a $2,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (méthyle α -D-galactopyranoside) ;

Isolectine A₄ : k_a $1,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (résidu α -D-GalNAc en position terminale non réductrice ; réagit strictement avec les érythrocytes du groupe sanguin A).

Lectines du germe de blé (Triticum vulgare)

β -D-GlcNAcp - (1→4)- β -D-GlcNAcp-(1→4)-D-GlcNAc > β -D-GlcNAcp - (1→4) -D-GlcNAc » D-GlcNAc

M 43200 ; α : 21600 ; au moins trois isolectines ; pH > 4 : α_2 ; solution acide : α ; $n = 2$

Ca^{++} ;

K_a $5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20°C) {(H→4)-[β -D-GlcNAcp -(1→4)]₄ - (1→OH)} ;

K_a $1,3 \times 10^3$ (4°C) (D-GlcNAc).

Lectines du soja (Glycine max)

α -D-GalNAcp = β -D-GalNAcp > α -D-Galp

M 122000 ; α 30000 ; α_4 ; $n = 4$;

Ca^{++} , Mn^{++} ;

K_a $3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (4°C).

Lectine de l'escargot (Helix pomatia)

α -D-GalNAc - (1→3)-D-GalNAc > α -D-GlcNAc p » α -D-Gal

M 79000 ; α 13000 ; au moins douze isolectines ; α_6 ; $n = 6$; k_a $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (pentasaccharide du groupe sanguin A : α -D-GalNAcp - (1→3)-[α -L-Fucp (1→2)]- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcNAcp -(1→6)-R).

Lectines I du genêt (Ulex europaeus)

α -L-Fuc

M 60000 - 68000 ; α 29000, β 31000 ; $\alpha\beta$;
 Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} ;
 K_a $3,1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ (L-fucose).

Lectines de la limace (Limax flavus)^[4]

Neu5Ac

M 44000 (2 x 22000) ; $n = 2$;
 k_a $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Neu5Ac).

15.4.4 Propriétés biologiques des lectines^[5]

Nous ne reviendrons pas ici sur les propriétés d'agglutination de cellules dont nous avons déjà parlé au paragraphe 15.4.2. Une de leurs caractéristiques les plus impressionnantes est leur pouvoir mitogène, c'est-à-dire qu'elles déclenchent dans une colonie de lymphocytes, en état de repos et de non division, un état de croissance et de prolifération. Cet effet mitogène est presque toujours inhibé par des sucres simples, de façon réversible, par exemple dans le cas de la concanavaline A. Signalons au passage qu'un certain nombre d'agents autres que les lectines, mais également capables de réagir sur les sucres périphériques des lymphocytes sont également mitogènes. Les lectines les plus utilisées comme mitogènes sont la Concanavaline A et la lectine de *Phaseolus vulgaris*. Contrairement aux antigènes qui activent des clones spécifiques, les lectines agissent de façon indiscriminée sur une population appropriée et la proportion de cellules stimulées peut atteindre 80 %. On observe simultanément une stimulation générale de toutes les activités métaboliques, mais aussi la sécrétion d'une famille de polypeptides actifs biologiquement, les lymphokines. Il est probable que la phase initiale de la stimulation est l'association de la lectine aux sucres de la surface cellulaire, mais l'association n'apparaît pas suffisante dans tous les cas.

Il y a un certain nombre d'autres propriétés très caractéristiques, mais leur exposé suppose des connaissances en hématologie qui dépassent le cadre de cet ouvrage.

15.4.5 Comparaison des anticorps anti-sucres et des lectines

Évidemment cette comparaison s'impose. La similitude tient en peu de mots : lectines et anticorps sont des protéines (ou glycoprotéines) possédant plusieurs sites d'association réversible sur leur molécule, qui en font des réactifs de réticulation réversible. Donc avec les deux familles de molécule, on observe l'association avec des mono- et oligosaccharides, la précipitation des macromolécules polysaccharidiques et glycoprotéines avec dissolution des précipités en présence d'un excès de polysaccharides, et enfin l'agglutination de cellules. Précipitation et agglutination sont une conséquence de la mutivalence des deux réactifs oppo-

sés et sont inhibées en présence du ligand mono- ou oligosaccharidique spécifique. Une autre conséquence de la multivalence, observée avec lectines et anticorps, est l'augmentation de l'affinité apparente lorsque le substrat permet la réticulation. Ceci dit, les immunoglobulines sont construites sur un modèle uniforme ou par association de molécules bâties selon ce même modèle, tandis qu'il semble qu'il y ait une grande variété de structure dans les lectines. Dans le modèle de base des immunoglobulines, les deux sites de reconnaissance sont solidaires de deux demi-molécules identiques liées entre elles par des ponts disulfure. En revanche, la lectine est une association de sous-unités qui peuvent comporter ou ne pas comporter de site de reconnaissance et sont liées de façon non covalente, probablement grâce à des contacts entre des surfaces étendues de plis β .

RÉFÉRENCES

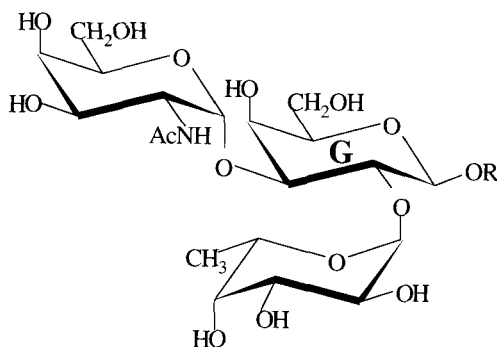
- [1] I. G. Goldstein et C.E. Hayes, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35 (1978) 127-340.
- [2] *The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, ouvrage collectif publié sous la direction de I. E. Liener, N. Sharon et I. J. Goldstein, Academic Press, New York 1986.
- [3] I. J. Goldstein, *The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, *op. cit.*, page 35.
- [4] R. N. Knibbs, S. E. Osborne, G. D. Glick et I. J. Goldstein, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 18524-18531.
- [5] H. Lis et N. Sharon, *The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, *op. cit.*, page 266.

Les antigènes de groupes sanguins : substances A, B, H et connexes

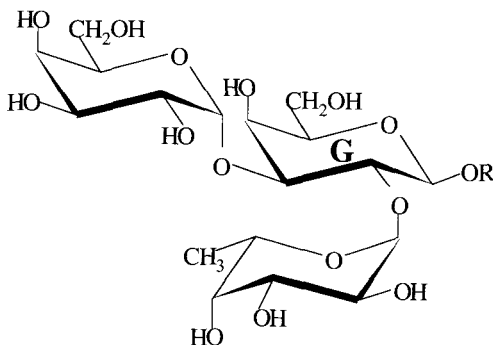
16.1 LES ANTIGÈNES A, B ET H^[1] [2] [3]

16.1.1 Généralités. Polymorphisme

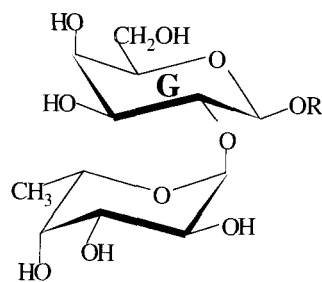
Les *déterminants antigéniques* sont le trisaccharide A, **16.1**, le trisaccharide B, **16.2**, et le disaccharide H, **16.3**. Le lecteur reconnaîtra que les trisaccharides A et B sont les produits de la glycosidation du disaccharide H sur la position 3 du galactose, par, respectivement, une unité *N*-acétylgalactosamine et une unité galactose et dans les deux cas avec l'anométrie α . Donc les déterminants A et B ne diffèrent que par leur substitution en 2 sur leur unité terminale non réductrice *D-galacto*, *N*-acétyle dans la substance A, hydroxyle dans la substance B. On notera aussi la participation du sucre désoxygéné fucose et enfin les liaisons α *cis*-1,2, moins fréquentes que les liaisons β *trans*-1,2 dans les glycoconjugués. Ces di- et trisaccharides sont situés aux extrémités terminales non réductrices des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines et des glycolipides et, éventuellement, de leurs ramifications. Les individus du groupe A présentent le déterminant A et une certaine quantité de H, mais non B, tandis que ceux du groupe B présentent B et H mais non A, de façon symétrique. Les individus du groupe O ne présentent que le déterminant H. Ceci suggère tout de suite une biosynthèse incomplète, due à l'absence ou à la non-expression des gènes qui codent les glycosyltransférases A ou B. Les molécules porteuses se trouvent sur la paroi des érythrocytes et les déterminants sont exposés vers l'extérieur. Chez les individus du groupe A, la molécule B est reconnue comme étrangère et suscite l'apparition d'un anticorps anti-B. Pour la même raison, dans le sang B, on trouve l'anticorps anti A et dans le sang O les anticorps anti-A et anti-B. Les accidents observés à l'introduction de la pratique des transfusions sanguines étaient dus à la présence de ces anticorps. Ainsi le sang d'un donneur du groupe A qui contient l'anticorps anti-B produit l'agglutination des érythrocytes d'un receveur du groupe B, etc. Mais les antigènes ABH sont également présents à la surface des cellules de la majorité des organes et dans les sécrétions. Ils sont une cause majeure de rejets de greffon donneur et receveur appartenant à des groupes différents. Pour cette raison, on juge qu'on devrait également leur donner le nom d'antigènes tissulaires.



16.1



16.2



16.3

Les antigènes ABH présentent à un degré élevé le phénomène de *polymorphisme*. Ceci signifie que les déterminants ABH peuvent être portés par une multiplicité de molécules chimiques différentes. Les différences de structure lointaines n'ont pas de conséquences sur la réaction immunochimique A-anti-A, par exemple, mais les différences très proches peuvent se manifester avec les techniques fines des anticorps monoclonaux. Les causes de polymorphisme sont : a) la nature de l'antigène complet, glycolipide, ou glycoprotéine glycoside, ou glycoprotéine glycosaminide ; b) la séquence de sucres sur la chaîne qui joint le cœur du glycoconjugué aux déterminants antigéniques et, tout particulièrement, la présence ou non de ramifications ; c) la nature de la jonction du déterminant à l'oligosaccharide.

Le lecteur qui éprouverait ici et ci-dessous un sentiment de confusion devant ces formules peut se reporter au résumé pictural donné par la figure 16.6 en fin de chapitre.

16.1.2 Types de jonction. Le système Lewis

On observe quatre modes de jonction du galactose G des formules **16.1** à **16.3** à la chaîne porteuse du glycoconjugué, les « types » 1 à 4, rassemblés dans le

tableau 16.1. Nous soulignons que le galactose de gauche dans les formules du tableau 16.1 est le galactose G des antigènes ABH. La répartition de ces types de jonction disaccharidique est différente suivant la famille du glyconjugué porteur.

Type 1 : Gal- β -(1-3)-GlcNAc- β -(1-R)
Type 2 : Gal- β -(1-4)-GlcNAc- β -(1-R)
Type 3 : Gal- β -(1-3)-GalNAc- α -(1-R)
Type 4 : Gal- β -(1-3)-GalNAc- β -(1-R)

Tableau 16.1 Les quatre types de jonction des déterminants ABH.

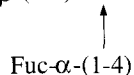
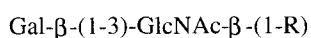
On rencontre les chaînes de type 1 et 2 à la fois sur les glycoprotéines, glycosides ou glycosaminides et les glycolipides, la chaîne de type 3 surtout sur les protéines glycosides et la chaîne de type 4 seulement sur les glycolipides.

La fucosylation enzymatique de la chaîne de type 1 donne les antigènes du groupe Lewis. Par exemple, dans l'antigène Lewis Le^a , il y a un résidu fucosyle sur la position 4 de GlcNAc, **16.4**. Une seconde fucosylation donne l'antigène Le^b , qui est donc un produit difucosylé, **16.5**. Les antigènes du type 1 sont les principaux porteurs des déterminants ABH dans les fluides corporels et les sécrétions. Ils ne sont pas synthétisés par les érythrocytes et les lymphocytes, qui néanmoins les absorbent à partir du plasma et, de ce fait, les expriment.

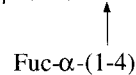
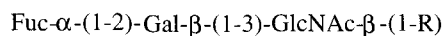
On observe les antigènes du type 2 sur la peau et les érythrocytes. La fucosylation transforme le disaccharide du type 2 en déterminant H, mais on observe aussi d'autres produits de fucosylation, **16.6** et **16.7**, qui sont respectivement isomères des antigènes Le^a et Le^b et ont reçu le nom d'antigènes Le^x et Le^y . Le lecteur aura reconnu la *N*-acétyllactosamine dans la chaîne de type 2.

On observe la chaîne de type 3 comme disaccharide de cœur des glycoprotéines glycosides, **16.8**. Le disaccharide-sérine (thréonine) est l'antigène T et son précurseur monosaccharidique l'antigène T_n . Les déterminants ABH sont construits directement sur le cœur disaccharidique. On a observé leur présence sur la muqueuse gastrique et dans la glycoprotéine des kystes de l'ovaire.

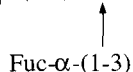
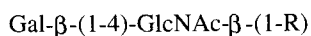
C'est dans cette catégorie qu'il faut ranger l'antigène « A périodique » correspondant à la séquence **16.9**. On voit que le déterminant A est construit sur un



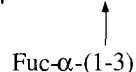
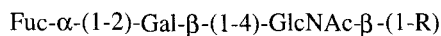
16.4



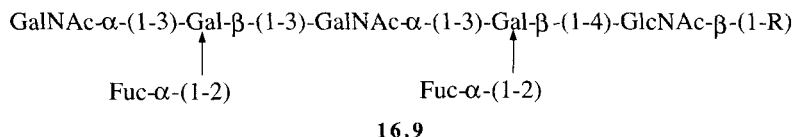
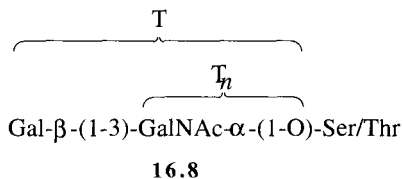
16.5



16.6



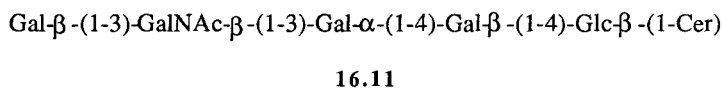
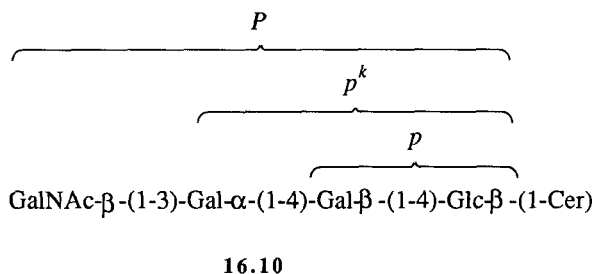
16.7

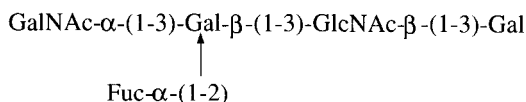
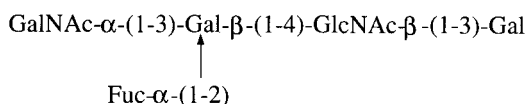
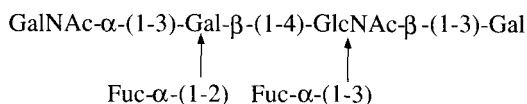


disaccharide de type 3. En fait, ce disaccharide est le produit de la galactosylation de l'unité GalNAc α d'un premier déterminant A. On a isolé un certain nombre d'antigènes glycolipidiques A-périodiques et il est possible qu'ils constituent plus de la moitié des substances d'activité A des érythrocytes. Naturellement, on ne trouve cet antigène que chez les individus A.

En ce qui concerne la chaîne de type 4, elle apparaît par galactosylation à l'extrémité terminale non réductrice de certains glycolipides, comme le globoside **16.10**, ce qui donne le précurseur **16.11**. Les structures sous les accolades dans la formule **16.10**, P, p^k et p sont trois des quatre déterminants antigéniques du système de groupe sanguin P. Les déterminants ABH peuvent se construire sur le galactose terminal non réducteur du globoside prolongé **16.11**. La majorité des antigènes ABH des reins appartiennent à cette famille.

D'après ce qui précède, le lecteur pourrait imaginer que les déterminants antigéniques ABH se réduisent à des di- et trisaccharides. Ceci serait possible, mais on a des raisons de penser que les déterminants antigéniques, en général, peuvent s'étendre sur des séquences plus étendues. On devrait alors distinguer les variantes dues au polymorphisme du système. Ceci a été possible par immunisation avec des antigènes soigneusement purifiées, en préparant ensuite les anticorps monoclonaux. Par exemple, parmi les anticorps anti-A monoclonaux, l'un recon-



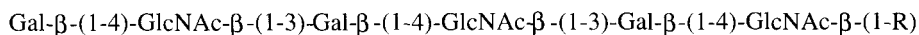
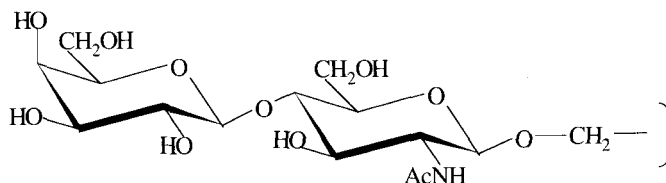
**16.12****16.13****16.14**

naît spécifiquement **16.12** (chaîne de type 1), un autre reconnaît **16.13** (chaîne de type 2), mais donne une réaction croisée avec **16.14** (type 2, difucosylé, appelé A/Le^y)

Les études sérologiques et génétiques ont montré que le groupe A se subdivisait en deux sous-groupes principaux, A₁ et A₂. Il n'y a pas encore d'explication définitive en terme de structure, mais de fortes indications concernant le sous-groupe A₁. Nous avons signalé ci-dessus la découverte d'un antigène A périodique, apparenté au type 3, exprimé seulement sur des glycolipides — sur le globoside pour le type 4. Or on ne les trouve que sur les érythrocytes A₁.

16.2 LE SYSTÈME II ET LES EFFETS DE RAMIFICATION

Le déterminant de l'antigène i est l'hexasaccharide linéaire **16.15**, trimère dicondensé de la *N*-acétyllactosamine^[4]. Le déterminant I, **16.16**, est une unité

**16.15****16.16**

N-acétyllactosamine branchée sur la position alcool primaire d'un hexopyranose^[4]. Il recouvre donc un *site de ramification*. Le déterminant i se présente comme un fragment des longues chaînes de poly-*N*-acétyllactosamine polycondensées liées aux mannoses du cœur des glycoprotéines glycosaminides et aux unités GalNAc (ou Gal) du cœur des glycoprotéines glycosides. De très longues chaînes de ce type, jusqu'à 40 monosaccharides, seraient présentes dans les glycolipides des érythrocytes de lapin, avec sept ramifications. On a isolé un glycolipide à 20 unités et trois ramifications du placenta humain. Ce sont, d'une manière générale, ces ramifications qui seraient le site de combinaison du déterminant I.

Ces antigènes, présents dans tous les individus humains, ne devraient pas être reconnus comme non-soi et susciter la synthèse d'anticorps. Cependant, il existe certaines conditions pathologiques, appelées maladies auto-immunes, où antigène et anticorps coexistent chez le même individu. Les anticorps dont nous allons parler ont reçu le nom d'agglutinines froides. L'agglutination des érythrocytes se manifeste par un trouble lorsqu'on refroidit le sang à 4°C, qui disparaît au retour à 37°C. Les sérums de ces malades sont une source d'anticorps anti-i et anti-I. Ces anticorps sont naturellement monoclonaux et servent de réactifs pour étudier la distribution des antigènes i et I dans les sujets normaux. Ainsi le sang du fœtus humain exprime l'antigène i, observable sur les érythrocytes du cordon ombilical. Au cours des dix-huit premiers mois d'existence du nourrisson, l'antigène i disparaît au profit de l'antigène I. En termes de structure, ceci s'interprète simplement par la ramification de la chaîne linéaire i, par couplage avec l'anométrie β du disaccharide *N*-acétyllactosamine sur les fonctions alcool primaire des résidus galactose. Nous reviendrons au chapitre 17 sur le rôle probable des antigènes i et I dans l'embryogénèse des mammifères. Ces questions de ramification seront l'occasion d'un bref retour sur les anticorps ABH. Les anticorps anti-sucres ont en général une affinité faible ou modérée. Celle-ci est très augmentée s'il y a plusieurs déterminants sur une seule molécule porteuse, ce qui est rendu possible si elle est ramifiée. La combinaison avec un anticorps à deux sites récepteur multiplie l'affinité par un facteur de l'ordre de $10^3 - 10^4$.

16.3 SYNTHÈSE DES DÉTERMINANTS OLIGOSACCHARIDIQUES

16.3.1 Déterminants ABH

Ces synthèses posent le problème difficile de la glycosidation 1,2-*cis* conduisant à des α -glycosides. C'est spécifiquement pour préparer certains de ces oligosaccharides que la méthode à l'ion commun a été élaborée (voir le paragraphe 10.3.3). La figure 16.1 donne la préparation du trisaccharide Le^a par fucosylation d'un dérivé protégé de la *N*-acétyllactosamine^[5]. La figure 16.2 illustre l'utilisation de la même méthode pour préparer un α -D-galactopyranoside, en l'occurrence le trisaccharide B^[6].

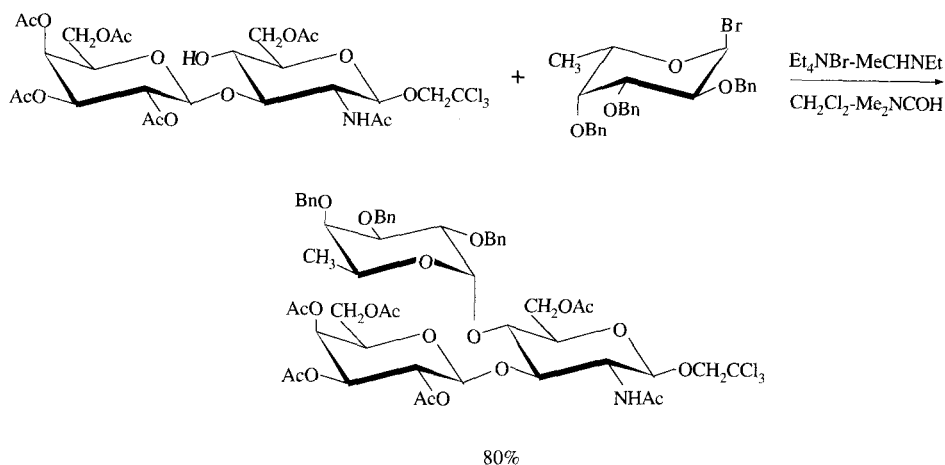


Figure 16.1 Synthèse du trisaccharide Le^a.

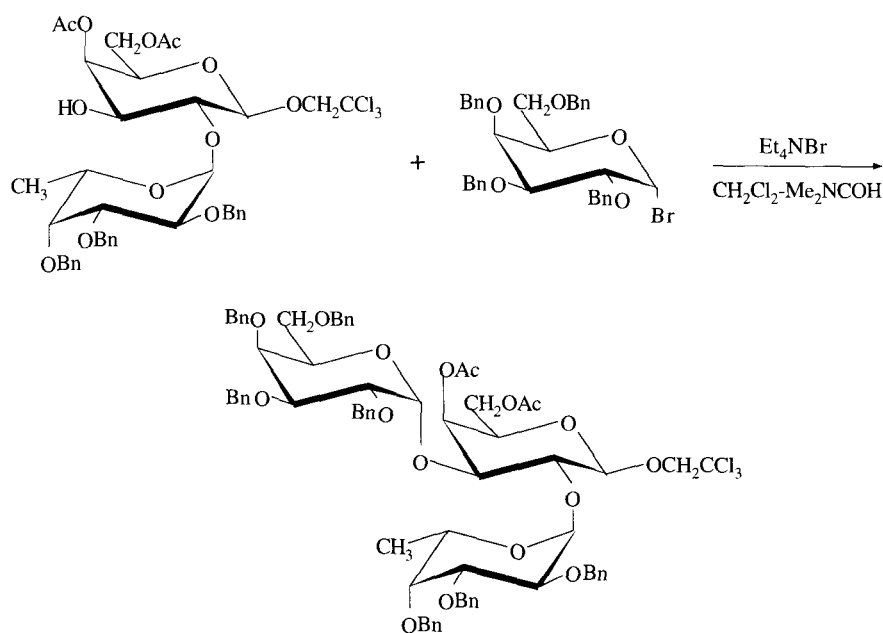


Figure 16.2 Synthèse du trisaccharide B.

Pour introduire une unité *N*-acétylgalactosamine α , 1,2-*cis*, il faut partir d'un réactif sans groupement participant. On emploie les halogénures de 2-azido-2-déoxy- α -D-galactopyranosyle **16.17** et **16.18** dont la préparation la plus habituel-

16.19

16.17 X = Cl
 16.18 X = Br

Figure 16.3 Réaction d'azidonitration.

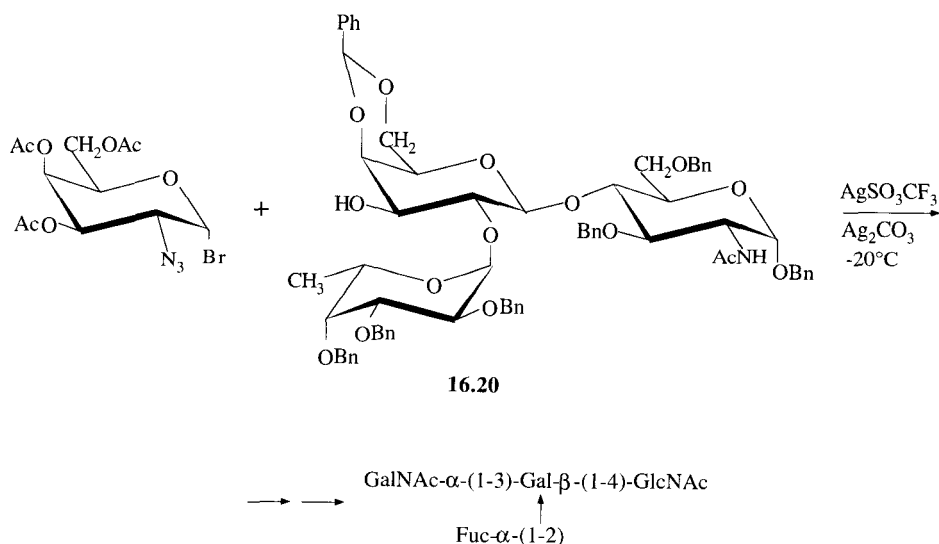


Figure 16.4 Synthèse d'un tétrasaccharide A.

16.3.2 Déterminants Ii

On a d'abord effectué la synthèse du déterminant I et des composés apparentés en couplant l'oxazoline **16.21** dérivée de la lactosamine peracétylée avec un galactose ayant la fonction alcool primaire libre (Fig. 16.5). Depuis les oxazolines ont été largement remplacées par les phtalimidochlorures pour le couplage β -1,2 *trans* des sucres aminés. Sur la figure 16.5, on voit que la fonction alcool en 3 du galactose accepteur est bloqué temporairement par allylation. Le déblocage sélec-

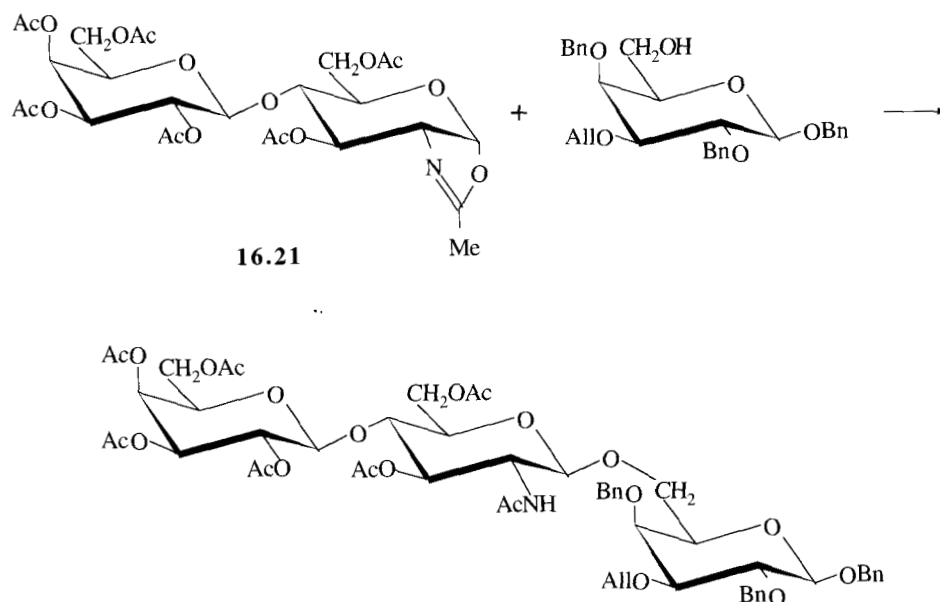
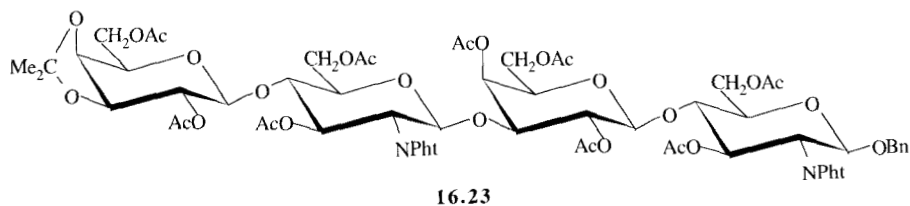
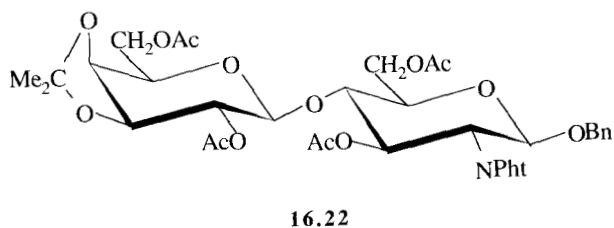
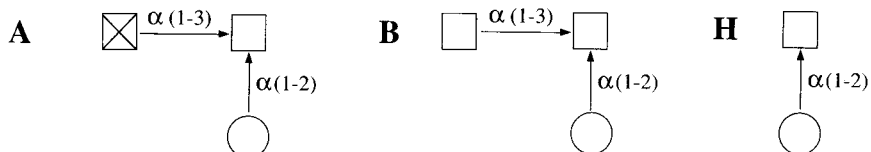


Figure 16.5 Synthèse du trisaccharide I.

tif de cette position libère un hydroxyle qui peut servir à l'extension de la chaîne dans une autre direction^[8].

La synthèse des oligosaccharides de la famille du déterminant i illustre une stratégie particulière de doublement^[9]. On part de la phthalimidolactosamine convenablement dérivée, **16.22**. Sur une portion, on hydrogénéolyse le benzyle anomérique et on convertit l'hydroxyle anomérique en trichloracétimide. On a





Types de jonction

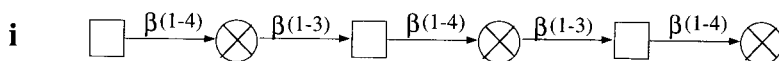
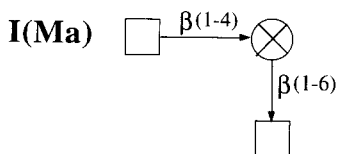
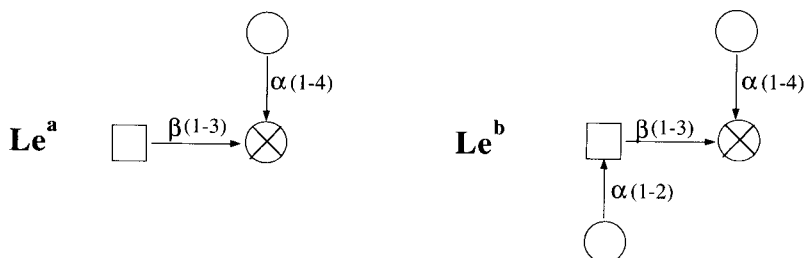
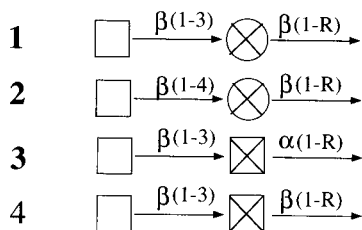
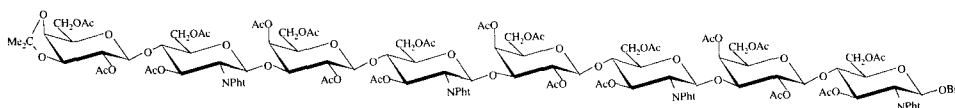


Figure 16.6 Résumé pictural de certaines séquences considérées au chapitre 16.

ainsi fabriqué le donneur glycosylant. Sur une autre portion de **16.22**, on pratique une hydrolyse acide modérée qui expose les hydroxyles en 3 et 4 de l'unité galactose. Mais seul l'hydroxyle en 3 est réactif au couplage dans ces conditions. Le



16.24

couplage donne le tétrasaccharide **16.23**. Une portion de **16.23** est activée sur le carbone de l'unité réductrice exactement comme ci-dessus et, dans une autre, on expose par hydrolyse acide la fonction alcool en 3 du galactose terminal non réducteur. Le couplage donne l'octosaccharide protégé **16.24**. Les essais immuno-chimiques faits avec cette collection de produits après déprotection semblent indiquer que le déterminant i est une chaîne hexasaccharidique. La figure 16.6 donne une représentation picturale des principaux déterminants antigéniques mentionnés dans ce chapitre.

RÉFÉRENCES

- [1] H. Clausen et Sen-itiroh Hakomori, *Vox Sanguinis*, 56 (1989) 1-20.
- [2] Sen-itiroh Hakomori, *Baillière's Clinical Haematology*, 4 (1991) 957-974.
- [3] Sen-itiroh Hakomori, *La Recherche* (1993) 548-554.
- [4] H.C. Gooi, A. Veyrières, J. Alais, P. Scudder, E. F. Hounsell et T. Feizi, *Molecular Immunology*, 21 (1984) 548-554, 1099-1104.
- [5] R. U. Lemieux et H. Driguez, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 4063-4069.
- [6] R. U. Lemieux et H. Driguez, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 4069-4075.
- [7] H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21 (1982) 155-224.
- [8] C. Augé, S. David et A. Veyrières, *Nouv. J. Chim.*, 1979 (3) 491-497.
- [9] J. Alais et A. Veyrières, *Carbohydr. Res.*, 207 (1990) 11-31.

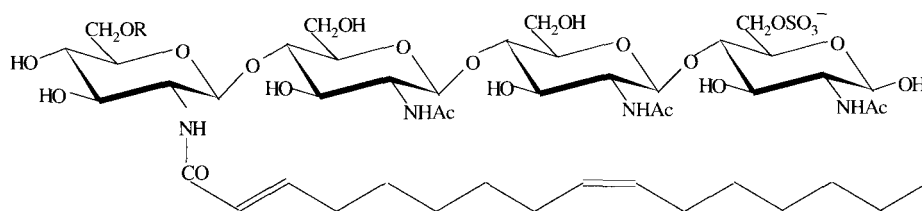
Réactions de reconnaissance d'oligosaccharides importantes dans le monde vivant

17.1 INTRODUCTION

Nous avons choisi ces exemples non seulement en raison de leur importance, mais aussi avec l'espoir de rendre concrète aux yeux des chimistes organiciens la méthodologie appliquée. Un volume récent de symposium rend compte d'un certain nombre d'observations analogues dans les domaines les plus variés^[1]. Le lecteur intéressé pourra s'y documenter sur des questions que nous n'aborderons pas, comme l'intervention des oligosaccharides dans la fertilisation des mammifères et le développement embryonnaire du système nerveux. Dans le cadre plus limité de ce chapitre, tous les exemples, sauf le premier, viennent du monde animal. La matière de ce chapitre paraîtra peut-être disparate au lecteur, mais précisément, l'auteur cherche à le convaincre du caractère général et de la variété des associations supramoléculaires protéine-sucre dans le monde vivant.

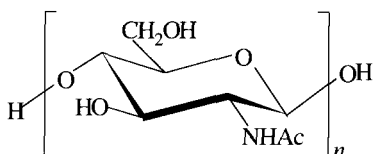
17.2 LE SIGNAL DE NODULATION DES RHIZOBIA

Les tétrasaccharides **17.1** et **17.2** jouent un rôle fondamental dans la symbiose entre les *Rhizobia* et les légumineuses. Ils induisent la formation des nodosités des racines qui permettent la fixation de l'azote et la déformation des radicelles sur la luzerne^[2]. Ils sont inactifs sur la vesce, qui, par contre, répond à des analogues non sulfatés. On reconnaît là un fragment tétrasaccharidique du polymère chitine, **17.3**, produit de soutien de la carapace des crustacés. L'acétolyse de la chitine ($\text{Ac}_2\text{O} - \text{H}_2\text{SO}_4$) la décompose en *N*-acétylglucosamine et oligosaccharides ($n = 2, 3, 4, \dots$), peracétylés. Les composés **17.1** et **17.2** se distinguent du « chito-tétraose » **17.3** ($n = 4$) par les substitutions suivantes : sulfation de la fonction alcool primaire de l'unité réductrice et, dans l'unité terminale non réductrice, remplacement de l'acétyle par un groupement dérivé d'un acide gras non saturé et acétylation éventuelle de l'hydroxyle primaire. On a fait la synthèse^[3] des tétrasaccharides **17.1** et **17.2** par addition successive d'unités glucosamine convena-

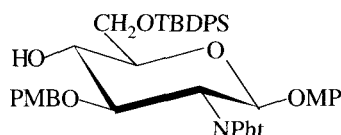


17.1 R = H

17.2 R = Ac



17.3



17.4

MP 4-méthoxyphényl

PMB 4-méthoxybenzyl

TBDPS tert-BuPh₂Si

PhI phthalimido

blement protégées. Le précurseur **17.4** de l'unité réductrice contient quatre types de groupements protecteurs (voir le paragraphe 5.1.1). Un cinquième type, *ter*-BuMe₂Si, protège la fonction alcool primaire du précurseur de l'unité terminale non réductrice. Le couplage utilise l'activation par transformation en fluorures. On arrive finalement à un tétrasaccharide glycoside, où toutes les fonctions alcool sont protégées par des groupements MP ou PMB, sauf deux, protégés par silylation. On hydrolyse sélectivement l'éther *ter*-butyldiméthylsilyle sur la fonction alcool primaire de l'unité terminale non réductrice en milieu acide modéré (tosylate de pyridinium) et on acétyle. On hydrolyse l'éther *ter*-butyldiphénylsilyle avec le fluorure de tétrabutylammonium et on convertit l'alcool en sulfate acide avec le complexe SO₃ - Me₃N dans la pyridine. Finalement, on obtient **17.2** en éliminant les éthers restants par oxydation par le nitrate de cérium et d'ammonium.

17.3 LE PENTASACCHARIDE ACTIF DE L'HÉPARINE

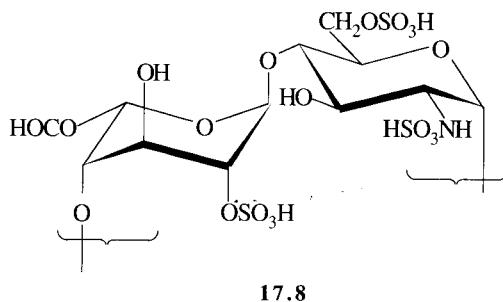
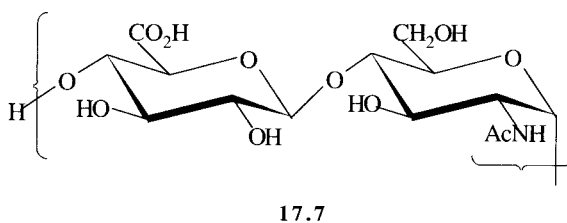
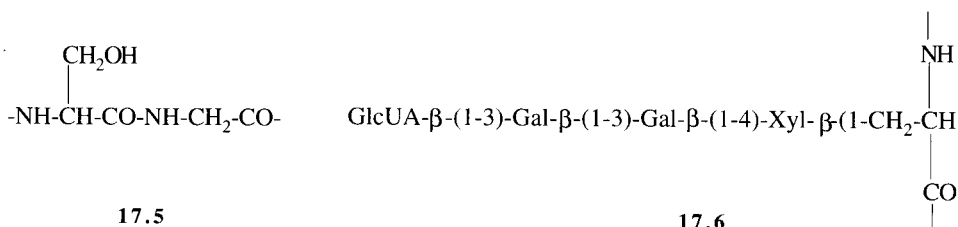
17.3.1 Isolement de l'héparine^{[4] [5]}

La source commerciale la plus habituelle est la muqueuse intestinale du porc, dont on peut retirer plus de 100 mg/kg. C'est un polyacide qu'on extrait des tissus autolysés par une solution alcaline. On coagule les protéines au chauffage. Le

refroidissement précipite une association héparine-protéine, qu'on débarrasse de lipides contaminants par extraction à l'alcool ou l'acétone. Après redissolution, on élimine les protéines par digestion trypsique. On sépare des contaminants de la même famille par l'intermédiaire d'un sel de baryum cristallisé ou de sels d'ammoniums quaternaires insolubles. On peut purifier l'héparine sur des colonnes d'échangeurs d'anions. C'est la molécule la plus chargée de la série et celle qui nécessite les concentrations en sels les plus élevées ($\geq M$) pour son élution.

17.3.2 Biosynthèse de l'héparine

Elle est particulièrement intéressante, car elle montre bien comment s'introduit l'hétérogénéité dans cette molécule primitivement régulière. Au départ se forme une colonne vertébrale polypeptidique, comportant une quinzaine de résidus glycine et L-sérine alternants, dont le dessin **17.5** représente un élément possible. A la plupart des résidus sérine, des transférases appropriées ajoutent successivement des unités β -D-xylopyranosyl, β -D-galactopyranosyl deux fois et β -D-glucurono-



syl, ce qui donne le glycopeptide **17.6**. C'est sur l'unité β -D-GlcUA que va maintenant se construire la chaîne du glycosaminoglycane par addition alternée d'unités α -D-GlcNAc et β -D-GlcUA. Le motif périodique est alors **17.7**. Cette chaîne régulière subit dans l'ordre, les modifications qui suivent : a) dé *N*-acétylation et sulfation de l'azote, qui remplacent -NHAc par $\text{NH}\text{SO}_3\text{H}$; b) épimérisation en C(5) qui transforme le résidu D-glucuronique en L-iduronique ; c) sulfation de l'oxygène O(2) du résidu iduronique ; d) sulfation de la fonction alcool primaire. La nouvelle chaîne est principalement constituée d'éléments disaccharidiques **17.8**, mais il y a parfois des arrêts en cours de route, si bien que les chaînes deviennent hétérogènes. Le poids moléculaire est 60 000 - 100 000, mais il y a ensuite une hydrolyse de certaines liaisons peptidiques et glycosidiques qui donnent finalement un mélange de poids moléculaire 5 000-25 000.

17.3.3 Dégradation de l'héparine

Le motif **17.8** reste dominant. La liaison sulfamique est hydrolysée en milieu acide et l'hydrolyse acide donne le chlorhydrate de la glucosamine comme unique sucre aminé. Le traitement par l'acide nitreux en milieu acide donne principalement le disaccharide **17.9**. La rupture de la liaison glycosidique et la régression de cycle s'observent déjà sur le méthyl α -D-glucosaminide, dont le réarrangement est représenté schématiquement à la figure 17.1. En raison de l'instabilité d'un ion carbénium sur C(2), le départ d'azote est probablement concerté avec l'attaque par la liaison C(1)-O(5). La régression de cycle donne alors un ion oxocarbénium, qui donne avec l'eau un héli-acétal instable dans ces conditions. Celui-ci est vite hydrolysé en aldéhyde et méthanol.

On sait induire des enzymes capables de dégrader l'héparine, l'héparinase et l'héparanase, chez la bactérie *Flavobacterium heparinum*, en cultivant cet organisme sur des polysaccharides de la même famille. Le produit de clivage est alors

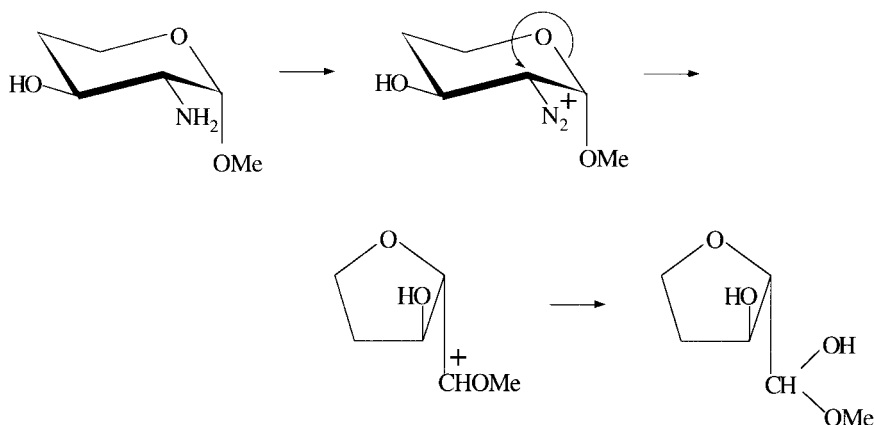
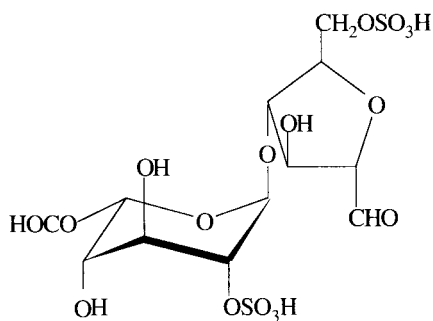
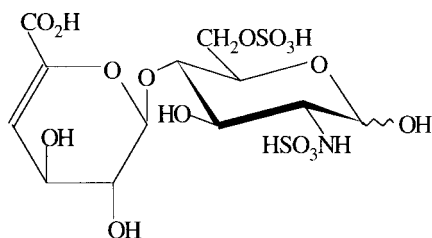


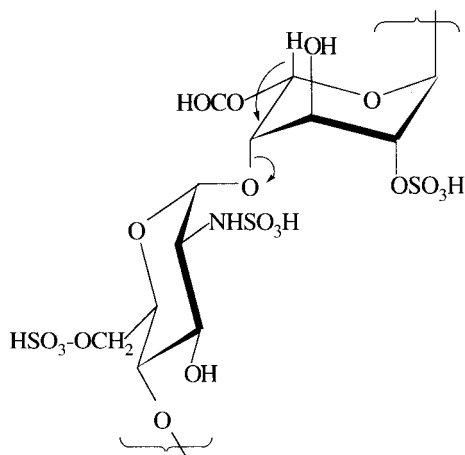
Figure 17.1 Réarrangement d'un glycoside d'amino-sucre par désamination nitreuse.



17.9



17.10

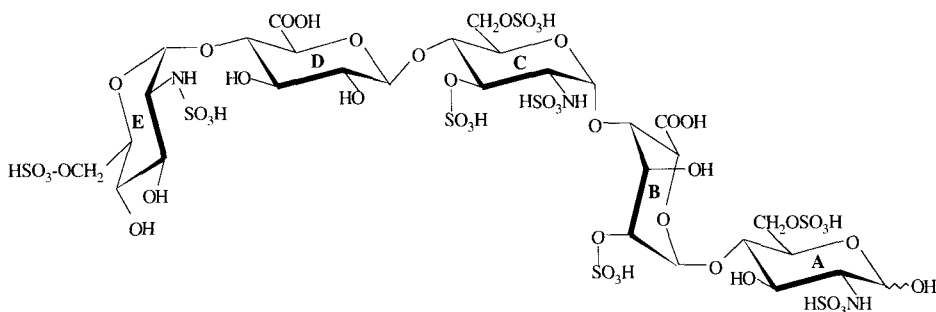


17.11

le disaccharide **17.10**, qui, dans les cas les plus favorables, est obtenu avec un rendement de 80 %. Le lecteur reconnaîtra une β -élimination, à première vue très compréhensible, d'un oxygène en β d'un carboxyle. Elle devrait être encore plus facilitée par la disposition *trans* diaxiale des deux substituants qui s'éliminent, **17.11**. Cependant, en lisant les protocoles d'extractions, on doit conclure que l'héparine est stable dans les solutions alcalines concentrées chaudes. Il est possible que la surabondance de charges négatives au voisinage de H(5) dans ces conditions empêche l'approche d'une base et la déprotonation.

17.3.4 Le pentasaccharide actif

L'héparine empêche la coagulation du sang en s'associant à une protéine du plasma, l'antithrombine III (AT III). Ceci entraîne l'inactivation d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans le processus de coagulation. On démontre cette réaction *in vitro* par chromatographie d'affinité : on attache de façon cova-



17.12

lente la protéine AT III à de l'agarose activé au bromure de cyanogène (voir le paragraphe 10.4)^[6]. On pratique ce couplage en présence d'un excès d'héparine pour protéger les sites de AT III impliqués dans la reconnaissance de l'héparine. Si on fait passer au travers d'une colonne de cet absorbant agarose-AT III une solution d'héparine dans NaCl 0,2 M, au pH 7,5 (donc sous forme sel de sodium), on constate que l'héparine est retenue. On peut dissocier cette combinaison en forçant la concentration saline de l'éluant (0,2 M $\rightarrow$ 3 M). Des expériences similaires avec des fragments d'héparine produits par désamination ou élimination enzymatique ont montré que le site de reconnaissance sur l'héparine se réduit à une séquence de 5 résidus monosaccharidiques, disposés comme dans le pentasaccharide (synthétique) **17.12**. La séquence de **17.12** se distingue de la séquence prévalente par un résidu glucuronique, sans doute témoin d'une biosynthèse incomplète, et d'une glucosamine trisulfatée. Ce troisième sulfate est indispensable pour l'activité biologique. On peut mettre en évidence la combinaison pentasaccharide **17.12**-AT III par chromatographie sur une colonne de Séphadex^[7]. Ce type d'absorbant présente des cavités de dimension normalisée et retient d'autant plus une molécule qu'elle est plus petite et peut y rentrer. Les protéines sont exclues et suivent pratiquement le front de la solution. La figure 17.2 donne les profils d'élu-tion, avec NaCl 0,15 M (pH 7,5) comme éluant. La protéine AT III est rapidement éluee, en A. Le pentasaccharide **17.12**, *seul*, est retardé, et sort de la colonne en B. En chromatographiant un mélange équimoléculaire de AT III et **17.12**, on n'observe qu'un pic d'élu-tion, en A, qui est celui de l'association **17.12**-AT III, qui est exclue comme AT III.

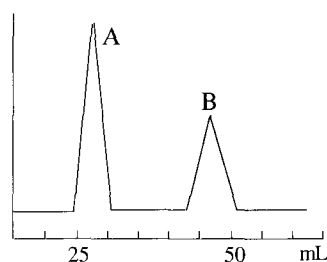
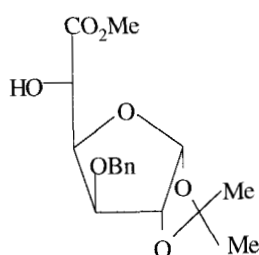
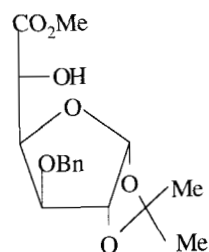


Figure 17.2 Profils d'élu-tion sur Séphadex G-60, de l'antithrombine III et/ou de son ligand **17.12**, avec NaCl 0,15 M comme éluant (pH 7,5).

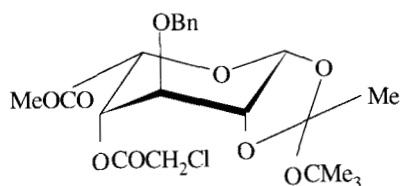
Nous allons esquisser les grandes lignes de la synthèse de **17.12**. La configuration *L-ido* est réalisée par inversion de la configuration de C(5) sur le furanose **17.13**. La désacétalation en milieu acide de **17.14** donne le pyranose qui, en un certain nombre d'étapes, est activé par conversion en orthoester **17.15**. On obtient un précurseur du fragment **AB** de **17.12** par condensation de cet orthoester avec la glucosamine protégée **17.16**. On obtient un précurseur du fragment **CD** en condensant le bromure **17.17** sur l'anhydro **17.18**. La condensation des deux disaccharides protégés **AB** et **CD** donne le tétrasaccharide précurseur du fragment **ABCD**, auquel l'unité monosaccharidique **E** est ajoutée en fin de synthèse. La sulfation a lieu en deux temps : la synthèse a conduit à un pentasaccharide où tous les hydroxyles à sulfater sont acétylés, tandis que les précurseurs des fonctions amines, azide (introduite avec **17.18**) et benzyloxycarbonyle (introduite avec **17.16**) sont encore intacts. Après désacétylation, on sulfate les cinq hydroxyles



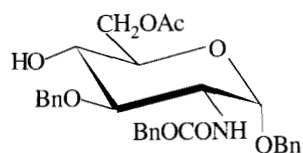
17.13



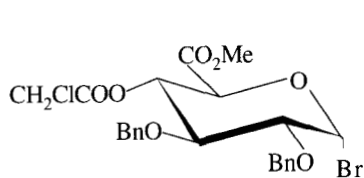
17.14



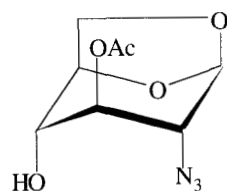
17.15



17.16



17.17



17.18

libérés par le système $\text{SO}_3 - \text{Me}_3\text{N}$ dans la diméthylformamide. On introduit ensuite les fonctions amines par hydrogénation catalytique, et on procède à la *N*-sulfation dans l'eau (pH 9,5), avec le même complexe $\text{SO}_3 - \text{Me}_3\text{N}$ ^{[8] [9]}.

17.4 MARQUEURS TUMORAUX

17.4.1 Méthode de recherche

Les recherches décrites dans ce paragraphe et le suivant^[10] sont, en fin de compte, des analyses de la composition des surfaces cellulaires en molécules diverses. Si elles apparaissent comme à la frontière de la chimie organique, c'est parce que la complexité du problème et les difficultés expérimentales imposent le recours aux méthodes très fines de l'immunochimie. C'est aussi parce que les objectifs sont la résolution de problèmes biologiques ou médicaux. La voie d'approche la plus employée est de susciter chez un animal la formation d'anticorps par immunisation avec des cellules entières ou leur membrane. On obtient avec une cellule déterminée un mélange d'anticorps, qui sont séparés et reproduits à plus grande échelle par la technique des hybridomes (voir le paragraphe 15.2). Un grand nombre de ces anticorps monoclonaux ont été préparés de cette façon. Il faut alors déterminer leur spécificité, ce qui n'est pas un problème simple. Il faut disposer d'une collection d'antigènes dont la structure est connue et les essayer tour à tour pour trouver ceux qui se combinent à un anticorps monoclonal donné. Des considérations d'analogie chimique ou une intuition biologique ou médicale peuvent guider la recherche. Lorsqu'on a trouvé qu'une molécule est antigénique, il faut reconnaître sa partie active dans la combinaison immunochimique, le déterminant. En effet, sur la surface des cellules, ce déterminant pourra s'exprimer sur des molécules différentes de celles de l'antigène qui a servi à caractériser l'anticorps. Finalement, dans l'hypothèse optimiste, l'immunochimiste a à sa disposition une batterie d'anticorps monoclonaux, chacun doué d'une spécificité particulière, qui permet de prouver l'existence de certains éléments de structure sur la surface d'une cellule. Toutes les spécificités découvertes de cette façon correspondent à des antigènes oligosaccharidiques, voisins des antigènes des groupes sanguins ABH. Les déterminants sont portés soit par des glycolipides, soit par des protéines.

Le lecteur pourra mettre en doute la rigueur de cette méthode : on ne pourrait pas découvrir un déterminant radicalement nouveau en testant des anticorps monoclonaux avec des antigènes déjà parfaitement connus. On peut, en tout cas, après avoir découvert une séquence active, la modifier chimiquement ou enzymatiquement de façon à créer une structure originale. Si cette modification augmente la réactivité immunitaire, on se rapproche de la spécificité authentique de l'anticorps monoclonal sous étude. On peut ainsi découvrir un déterminant encore inconnu. Quoi qu'il en soit les anticorps monoclonaux ont servi à mettre en évidence des différences entre cellules embryonnaires et adultes, entre cellules nor-

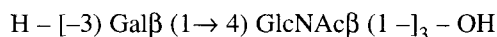
males et cancéreuses. Nous donnerons dans ce chapitre quelques exemples caractéristiques et un aperçu de certaines techniques expérimentales.

17.4.2 Antigènes tumoraux^[11]

Si l'on trouve une différence de composition caractéristique entre la surface d'une cellule tumorale et celle d'une cellule normale du même organe, on peut espérer fonder sur cette différence une réaction de diagnostic, éventuellement un procédé d'élimination. En utilisant des immunisations avec des types divers de cellules de tumeurs, on a préparé un très grand nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre leurs molécules de surface. Les déterminants découverts jusqu'à présent sont tous des oligosaccharides apparentées aux substances de groupes sanguins et dérivent soit de la charpente soit de la périphérie de ces substances. Ainsi on observe sur les métastases des tumeurs du côlon (mais non sur les tumeurs primaires) une accumulation des antigènes I et i, **17.19** et **17.20**. Ils sont liés à des glycoprotéines de type mucine, extraites des tissus correspondants.



17.19



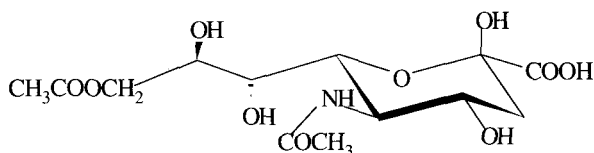
17.20

On a reconnu l'antigène 19.9 grâce à un anticorps monoclonal obtenu après immunisation de souris avec des cellules d'adénocarcinome du côlon humain. L'attachement de cet anticorps à ces cellules est inhibé par un traitement préalable avec la neuraminidase, ce qui indique la présence d'un résidu sialoside terminal dans le déterminant antigénique et suggère de rechercher l'antigène parmi les gangliosides. On extrait les glycolipides des cellules et on les sépare par chromatographie sur couche mince. Le révélateur est l'anticorps monoclonal, qui n'est retenu que sur la tache de l'antigène. On reconnaît l'emplacement de cet anticorps par combinaison spécifique avec une molécule marquée par ¹²⁵I. L'antigène présent sur la cellule tumorale qui a servi à l'immunisation est un ganglioside **17.21** où l'on reconnaît le déterminant antigénique des groupes sanguins Lewis^a, sialylé à l'extrémité non réductrice. Toutefois, dans le sérum des malades, le déterminant antigénique est lié à une glycoprotéine. L'antigène 19.9 est absent du côlon normal et utilisé en diagnostic.



17.21

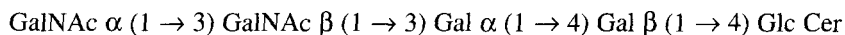
Par immunisation avec une lignée de cellules du rat, on a obtenu un anticorps qui réagit spécifiquement sur le cerveau embryonnaire du rat. L'antigène correspondant appartient donc au groupe des antigènes de différenciation traités au paragraphe 17.5. En raison de l'abondance des structures polysialylées dans ces tissus, il n'est pas étonnant que le déterminant antigénique soit un oligosaccharide sialylé. Cet antigène est également présent dans les gangliosides des cellules de mélanomes, où il est très abondant – ou très exposé. Il est remarquable par la présence d'une unité terminale non réductrice qui dérive de l'acétate en 9 de l'acide sialique **17.22**.

**17.22**

On a décrit un grand nombre d'autres antigènes de cellules tumorales. Le lecteur pourra se reporter aux tableaux donnés dans les références^{[10] [11]}. Toutefois, les anticorps correspondants ne doivent être utilisés en diagnostic qu'avec discernement. Comme le montre très bien le dernier exemple, la présence d'un antigène déterminé peut être caractéristique de la présence d'une tumeur dans un type d'organe et normale dans un autre. La mise au point d'un protocole de diagnostic doit éliminer cette cause d'erreurs.

17.5 ANTIGÈNES DE DIFFÉRENCIATION^{[12] [13] [14]}

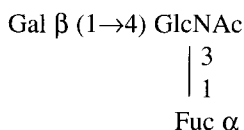
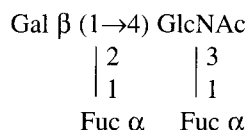
C'est le nom donné aux antigènes dont l'expression sur la surface des cellules varie aux cours des étapes successives du développement embryonnaire. L'immunisation d'un animal contre des cellules embryonnaires entières a permis d'obtenir finalement un grand nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface. Ainsi, on a mis en évidence l'antigène de Forssman dans l'embryon de la souris à ses tout premiers stades. Cet antigène correspond à la séquence oligosaccharidique du glycolipide **17.23**, mais la structure support pourrait être aussi bien une glycoprotéine. Cet antigène n'est plus exprimé que par quelques types de cellules chez la souris adulte.

**17.23**

D'autres étapes ont été précisées avec l'aide des anticorps monoclonaux naturels anti-I et anti-i. Le caractère d'antigènes de différenciation des antigènes Ii est

fortement suggéré par leur ordre d'apparition chez l'homme. L'antigène i, dont l'épitope est **17.20**, est exprimé sur les érythrocytes du nouveau-né, par exemple dans le sang du cordon ombilical. Il disparaît au cours de la première année de l'existence au profit de l'antigène I, épitope **17.19**. Ces structures sont sans doute portées à la fois par des glycolipides et des glycoprotéines. L'ordre d'apparition paraît rationnel, si on suppose que la ramification résulte de l'action de transférases. Cependant, c'est l'ordre inverse que l'on observe au cours du développement embryonnaire de la souris, comme nous allons le détailler ci-dessous.

On met en évidence l'expression des antigènes de différenciation au site même où ils se manifestent sur l'embryon par observation microscopique des coupes. Celles-ci sont traitées par l'anticorps qui se fixe aux sites où se trouve l'antigène. On élimine l'excès d'anticorps par lavage et on visualise sa présence aux sites où il a été retenu par combinaison spécifique avec une molécule fluorescente. C'est l'antigène I qui apparaît aux stades précoces, dès le zygote, et l'antigène i n'apparaît qu'après cinq jours, au début de la différenciation visible des cellules^[15]. Evidemment, l'apparition précoce de l'oligosaccharide ramifié est surprenante et, parmi les explications possibles, on a suggéré la persistance dans l'ovocyte d'une glycosyl transférase maternelle. Un nouvel antigène, SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen*), dont l'épitope est **17.24**, s'exprime au stade à huit cellules^[16]. Son expression est transitoire, car il n'est plus exprimé qu'en un nombre restreint de sites chez la souris adulte. Sa structure **17.24** suggère que son expression est le résultat de la fucosylation d'une unité terminale non réductrice N-acétyllactosamine des antigènes i ou I. Une seconde fucosylation, donnant **17.25**, abolit la réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti SSEA-I. Ces observations suggèrent un mécanisme pour expliquer l'apparition et la disparition des antigènes durant les diverses phases de l'embryogénèse : l'addition (par des transférases) ou l'élimination (par des hydrolases) d'unités monosaccharidiques. De même, chez l'homme, les antigènes de groupes sanguins, ABH apparaissent sur des organes variés à diverses étapes du développement et, parfois, ne sont plus finalement décelables.

**17.24****17.25**

On a exprimé l'opinion que ces antigènes de différenciation jouent le rôle d'un code postal. Ces molécules, par un système d'adhésions, commanderaient la route que doivent suivre les cellules d'un embryon pour arriver à leur place et, notamment, se rassembler dans les gros organes. Mais ce trafic doit être organisé par des « facteurs » ou des « agents de la circulation ». Il faut donc d'autres molécules pour reconnaître ces antigènes, rôle que pourraient tenir des lectines à proximité.

17.6 LES SÉLECTINES

17.6.1 Réaction inflammatoire et séllectines

Il se produit dans les tissus endommagés une mobilisation des leucocytes. Les leucocytes du flux sanguin sont ralentis, puis arrêtés le long de la paroi intérieure (endothéliale) des veinules, puis la traversent en s'insérant entre les cellules au voisinage de la lésion : c'est la réaction inflammatoire. Cette mobilisation fait intervenir une multiplicité de *molécules d'adhésion*, réparties en trois groupes, les intégrines, les superimmunoglobulines et les séllectines^[17]. Nous nous attacherons plus particulièrement à ce dernier groupe. Il y a trois séllectines E, P et L. La séllectine E apparaît sur les cellules endothéliales ; la séllectine P apparaît sur la majorité des classes de leucocytes.

Les séllectines sont des protéines dont la structure primaire a été élucidée par clonage. Elles sont bâties de façon analogue (Fig. 17.3). Ce sont des protéines transmembrannaires, dont l'extrémité acide baigne dans le cytoplasme tandis que l'extrémité aminée est dirigée vers l'extérieur. Partant de celle-ci, on rencontre d'abord une chaîne d'environ 120 résidus, le « domaine lectine », qui se rapproche des lectines animales (dont l'effet dépend de Ca^{++}). Ceci a fait d'emblée soupçonner l'existence de ligands oligosaccharidiques. Ensuite vient une séquence de 30 résidus aminoacides, dite *EGF*, puis une structure périodique constituée par un alignement de séquences de 62 résidus (6 pour E, 9 pour P, 2 pour L). Tout ceci constitue la portion des séllectines extérieure à la cellule. La séquence suivante correspond à la traversée de la membrane et la partie cytoplasmique est beaucoup plus courte. Le nom de séllectine rappelle l'analogie de ces protéines avec les lectines animales. Nous choisirons dans l'importante documentation sur les séllectines ce qui est relatif à la mise en évidence du ligand oligosaccharidique des séllectines E et L.

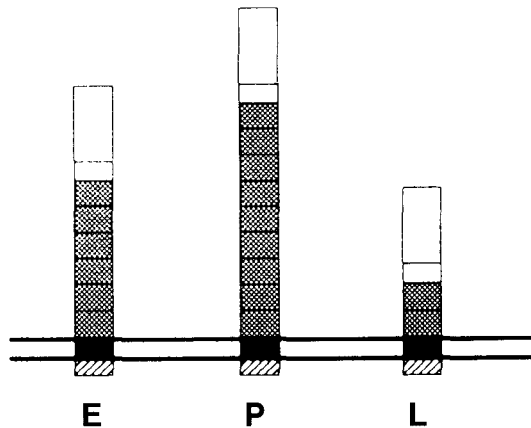
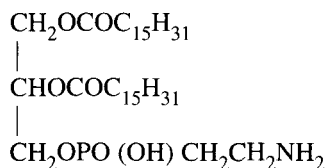


Figure 17.3 Architecture des séllectines E, P et L. Publié d'après J.M. Harlan et D.Y. Liu, *Adhesion, Its Role in Inflammatory Disease*, copyright © 1977 by W.H. Freeman and Company (reproduit avec l'aimable autorisation de l'éditeur).

17.6.2 Sélectines E

La sélectine E n'est pas exprimée sur les cellules vasculaires endothéliales « au repos ». Elle apparaît de façon transitoire lorsque l'agression des tissus en leur voisinage entraîne la sécrétion d'une *cytokine*, polypeptide actif, qui stimule sa biosynthèse. Les endotoxines bactériennes produisent le même effet. Par contre, la sélectine E serait exprimée de façon permanente dans l'arthrite rhumatoïdiale. La cellule activée accroche (ou freine) un leucocyte par association de ses molécules de sélectine E avec un oligosaccharide complémentaire présent à la surface du leucocyte. On peut aussi activer les cellules endothéliales en culture avec la cytokine. Ceci a permis le clonage de la sélectine E et, finalement, son expression de façon stable dans un autre type de cellules en culture, les cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Cette lignée, CHO-E sera l'outil de recherche pour découvrir le ligand oligosaccharidique complémentaire.

La méthode logique consisterait à séparer et isoler tous les oligosaccharides de la paroi leucocytaire et à les tester séparément. C'est rigoureusement impraticable. Il s'agira donc de deviner intelligemment les meilleurs candidats parmi les sources naturelles accessibles. Une méthode consiste à faire adsorber une quantité connue du produit à tester par les parois d'une cuvette en plastique, à recouvrir avec une suspension de cellules CHO-E, éventuellement marquées au tritium, et à doser la radioactivité persistante après lavage. Cette méthode se prête à des déterminations semi-quantitatives. Quoi qu'il en soit, il faut multiplier les essais, donc les tests doivent être faciles et rapides. La méthode des « néoglycolipides » se prête bien à cette exploration. Cette méthode part de l'observation des propriétés analytiques remarquables des glycolipides : ils se séparent très bien les uns des autres par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Il se prêtent bien à l'analyse de structure par spectrométrie de masse (voir le paragraphe 10.5.1). C'est pourquoi, si les ligands à tester ne sont pas déjà des glycolipides, mais des oligosaccharides obtenus par synthèse ou par dégradation de glycoprotéines, on les convertit d'abord en analogues de glycolipides, les néoglycolipides. Pour cela on les combine au dipalmitoyle de phosphatidyléthanolamine **17.26** par amination réductrice.



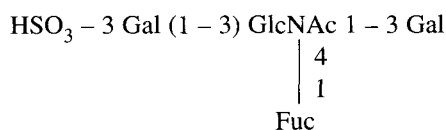
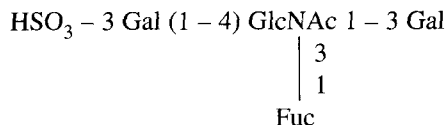
17.26

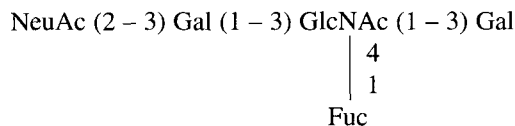
Ceci suppose que l'oligosaccharide a sa fonction aldéhyde potentielle intacte à l'extrémité terminale réductrice. Si ce n'est pas le cas, lorsque l'oligosaccharide a été obtenu par β -élimination alcaline réductrice, il faut faire apparaître une fonction aldéhyde par oxydation périodique (au détriment de l'intégrité de l'oli-

gosaccharide). Ces néoglycolipides se séparent par une technique familière aux chimistes organiciens, la chromatographie sur couche mince de gel de silice, avec un irrigant assez polaire, $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$, 60:35:8, v/v/v. Après la migration, on « révèle » la plaque en la recouvrant avec une suspension de cellules CHO-E qui expriment la séllectine E. S'il y a dans le mélange un oligosaccharide ligand de la séllectine E, les cellules viennent adhérer à la tache correspondante. On élimine l'excès de cellule par lavage et on repère le site d'adhésion en mettant en évidence les cellules fixées. Diverses méthodes de visualisation sont possibles. L'une d'entre elles utilise des cellules marquées au départ par du tritium et repère donc finalement la position du ligand par autoradiographie. On peut analyser directement les taches par spectrométrie de masse. On voit l'économie de temps réalisé avec cette méthode, puisqu'on n'analyse que les structures déjà repérées comme actives.

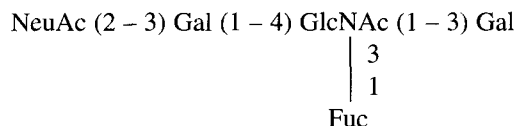
L'observation de départ est que les cellules CHO-E sont fortement retenues sur une glycoprotéine riche en carbohydrates d'origine ovarienne. Il y a donc sur cette glycoprotéine des séquences oligosaccharidiques qui se combinent à la séllectine E. On isole les oligosaccharides par hydrolyse acide et on les convertit en néoglycolipides. La technique de recouvrement décrite ci-dessus permet alors de mettre en évidence une fraction particulièrement active dans le mélange. L'analyse par spectrométrie de masse et méthylation indique qu'il s'agit d'un mélange équimoléculaire des néoglycolipides présentant les tétrasaccharides sulfatés **17.27** et **17.28** à l'extrémité terminale non réductrice. Une étude antérieure avait montré que les séquences des oligosaccharides sialylés **17.29** « 3'-sialyl-Le^a » et **17.30** « 3'-sialyl-Le^x » étaient également reconnues par la séllectine E, mais l'affinité de **17.27** et de **17.28** est supérieure.

En tout cas, cela souligne l'importance de l'anion dans cette reconnaissance particulière, car le détachement du résidu sialique dans **17.29** et dans **17.30** par l'enzyme neuraminidase abolit la réaction. La modélisation de la structure des tétrasaccharides **17.27** et **17.29** indique que leurs groupements anioniques ($-\text{SO}_3^-$

**17.27****17.28**



17.29



17.30

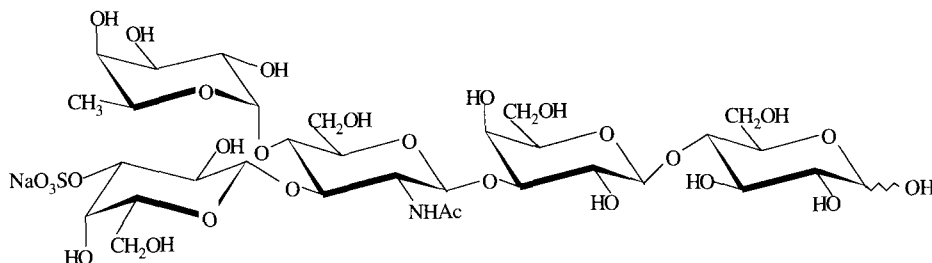
et CO_2^-) se trouvent sensiblement au même endroit de la molécule^[18]. Enfin, des modifications du résidu sialique qui laissent intact le carboxyle, comme le remplacement du groupement acétylamido par un groupement glycollylamido ou la destruction de la chaîne latérale par oxydation périodique, laissent intacte la réactivité.

17.6.3 Sélectine L

Cette molécule d'adhésion est impliquée dans la migration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques périphériques. Par des méthodes analogues à celles du paragraphe précédent, on observe les plus grandes affinités avec un mélange dont les composants présentent les structures de sulfates **17.27** et **17.28**. Il y a cependant des différences avec la sélectine E^[19].

17.6.4 Synthèse des ligands oligosaccharidiques des sélectines

La synthèse d'une collection d'oligosaccharides sulfatés ou sialylés a confirmé que les sulfates étaient les meilleurs inhibiteurs. Le plus actif est le pentasaccharide sulfaté **17.31**, qui est jusqu'à présent le meilleur ligand connu de la sélectine E, donnant 50 % d'inhibition à la concentration très basse $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ^[20].



17.31

RÉFÉRENCES

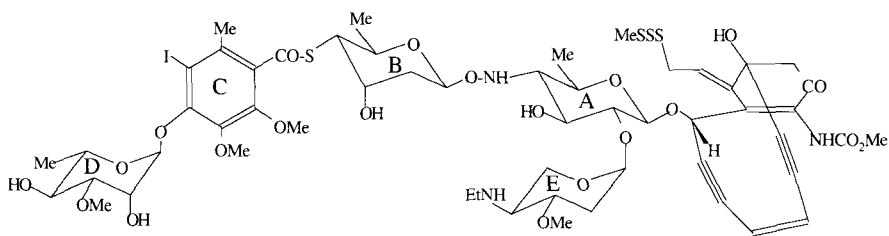
- [1] *Carbohydrate recognition in cellular function*, Ciba Foundation Symposium 145, Wiley and Sons, New York, 1989.
- [2] P. Roche, F. Debelle, F. Maillat, P. Lerouge, C. Faucher, G. Truchet, J. Demarie et J. C. Promé, *Cell.*, 67 (1991) 1131 (et les autres publications du même groupe en 1990-1991).
- [3] K. C. Nicolaou, N. J. Bocovitch, D. R. Carcanague, C. W. Hummel et L. F. Even, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 8701-8702.
- [4] B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 43 (1985) 51-134.
- [5] B. Casu, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 556 (1989) 1-17.
- [6] M. Höök, I. Björk, J. Hopwood et Ulf Lindahl, *FEBS Letters*, 66 (1976) 90-93.
- [7] J. Choay, M. Petitou, J.-C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu et G. Gatti, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 116 (1983) 492-499.
- [8] J.-C. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri et P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, 130 (1984) 221-241.
- [9] M. Petitou, P. Deuchaussoy, I. Lederman, J. Choay, P. Sinaÿ, J.-C. Jacquinet et G. Torri, *Carbohydr. Res.*, 147 (1986) 221-236.
- [10] T. Feizi, *Nature*, 314 (1985) 53-57.
- [11] T. Feizi, *Cancer Surveys*, 4 (1985) 245-269.
- [12] T. Feizi et R. A. Childs, *Trends in Biochemical Sciences*, 10 (1985) 24-29.
- [13] T. Feizi et R. A. Childs, *Biochem. J.*, 245 (1987) 1-11.
- [14] T. Feizi, *T. I.B.S.*, 16 (1991) 84-86.
- [15] A. Kapadia, T. Feizi et M. J. Evans, *J. Exptl. Cell. Res.*, 131 (1981) 185-195.
- [16] H. C. Gooi, T. Feizi, A. Kapadia, B. B. Knowles, D. Solter et M. J. Evans, *Nature*, 292 (1981) 156-158.
- [17] *Adhesion, its role in inflammatory disease*, sous la direction de J. M. Harlan et D.Y. Lice, Freeman, New York 1992, chapitres 2 et 3.
- [18] C. T. Yuen, A. M. Lawson, W. Chai, M. Larkin, M. S. Stoll, A. C. Stuart, F. W. X. Sullivan, T.J. Ahern et T. Feizi, *Biochemistry*, 31 (1992) 9126-9131.
- [19] P. J. Green, T. Tamatani, T. Watanabe, M. Miyasaka, A. Hasegawa, M. Kiso, C. T. Yuen, M. S. Stoll et T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 188 (1992) 244-251.
- [20] A. Lubineau, J. Le Gallic et R. Lemoine, *Bioorg. Med. Chem.* à paraître.

Y a-t-il une interaction de reconnaissance entre les oligosaccharides et l'ADN ?

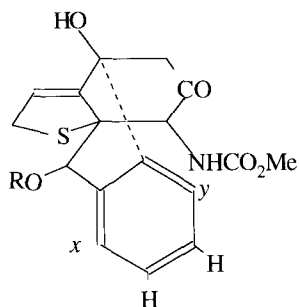
18.1 DONNÉES DU PROBLÈME

A la forme interrogative de ce titre, le lecteur aura compris qu'il s'agit d'acquis récents, dont l'interprétation définitive n'est peut-être pas assurée. Le problème a été posé par les propriétés d'une famille d'antibiotiques, les calichéamicines^[1] et espéramicines^[2], qui ont une cytotoxicité puissante et sont antitumorales. Nous consacrerons essentiellement ce chapitre à la calichéamicine γ_1^I , la plus étudiée, que nous désignerons simplement par le mot calichéamicine. Sur la structure **18.1** de ce composé, le lecteur reconnaîtra plusieurs éléments exceptionnels. C'est avant tout un glycoside, dont l'aglycone bicyclique, la calichéamicinone, contient un système ène-diyne dans un cycle à 10 carbones. On notera aussi le rare enchaînement trisulfure. La partie oligosaccharidique est également très particulière. Le résidu **B** est glycosidé par une hydroxylamine, si bien que la liaison entre **A** et **B** est un pont -NH-O-. Les résidus **B** et **D** sont liés par l'intermédiaire d'un benzène complètement substitué, **C**.

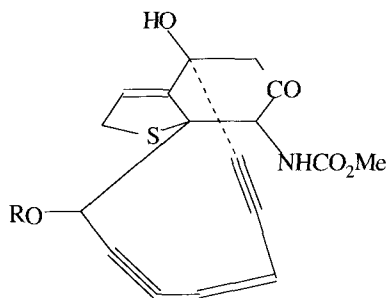
La cytotoxicité de la calichéamicine et de ses congénères est due à une rupture, apparemment irréparable, de la double hélice de l'ADN, conséquence d'une transformation remarquable de l'aglycone. On peut l'observer en l'absence d'ADN. Le traitement de la calichéamicine en solution dans CD_2Cl_2 par la triphénylphosphine donne le produit **18.2** (où R représente le résidu oligosacchari-



18.1



18.2

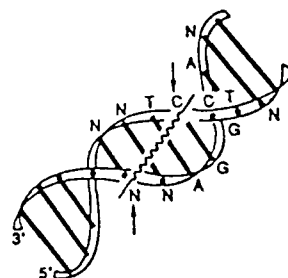


18.3

dique), avec un atome de deutérium à chacune des positions x et y . L'interprétation est la suivante : le réactif coupe le trisulfure, en séparant l'atome de soufre du côté de l'aglycone, qui se trouve alors sous la forme thiolate. L'addition de Michael du thiolate sur la cyclohexènone engendre le dihydrothiophène, **18.3**. Dans cet intermédiaire, le système ène-diyne est déstabilisé et il se cyclise en biradical benzénique, **18.2**, où x et y représentent, cette fois, des électrons célibataires, principalement localisés en ces deux sites. Ce biradical arrache deux atomes de deutérium au solvant.

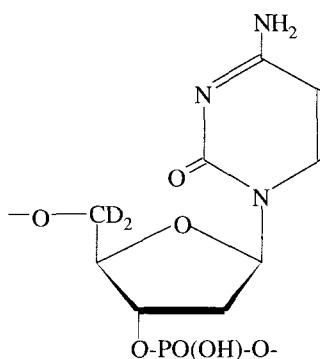
Avant d'examiner l'action sur l'ADN, nous rappellerons quelques conventions d'écriture dans ce domaine. Les majuscules A, G, C et T représentent respectivement les monosphosphates de la 2'-désoxyadénosine, la 2'-désoxyguanosine, la 2'-désoxycytidine et la thymidine (voir le paragraphe 3.6.3). Le symbole TCCT représente un fragment d'ADN de quatre nucléotides, où chaque nucléoside est relié à son voisin par un pont phosphodiester entre la fonction alcool en 5' de l'un des sucres et en 3' de l'autre. Les primes sont réservées aux numéros des carbones du désoxyribose. La notation 5'TCCT signifie que le pont phosphodiester relie la fonction alcool en 3' d'un nucléoside à la fonction alcool en 5' du suivant, dans l'ordre de la lecture. Cette convention s'applique bien sûr à n'importe quelle longueur ou composition du polynucléotide. Dans la double hélice de l'ADN, deux chaînes de polynucléotides sont associées, avec la correspondance bien connue des bases en vis-à-vis : adénine-thymine, guanine-cytosine. Au tétranucléotide TCCT correspond AGGA. Les deux chaînes sont disposées en sens inverse, si bien que, sur cette dernière séquence, lue dans cet ordre, le pont phosphodiester relie la fonction alcool en 5' d'un nucléoside à la fonction alcool en 3' de celui qui suit. En conséquence, le symbole complet est 3'AGGA. La figure 18.1 représente un fragment d'ADN en double hélice, où l'on a représenté plus précisément les tétranucléotides complémentaires, 5'TCCT et 3'AGGA, qui jouent un rôle dans les phénomènes décrits ci-dessous. L'identité des autres nucléotides, N, n'a provisoirement pas besoin d'être précisée. L'aglycone de la calichéamicine se loge dans le petit sillon entre les deux chaînes polynucléotidiques, de la façon indiquée par le

Figure 18.1 Localisation de la calichéamicine dans le petit sillon de la double hélice. Extrait de M. D. Lee, G.A. Ellestad et D.B. Borders, *Acc. Chem. Res.*, 24 (1991) 235-243 (publié avec l'aimable autorisation de *Accounts of chemical Research* ; © 1991 American Chemical Society).



5'GGGTCCTAAATT3'
3'CCCAGGATTTAA5'

18.4

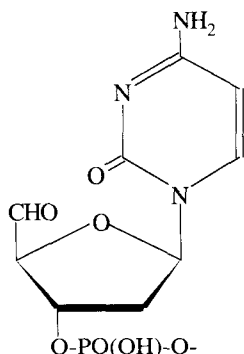


18.5

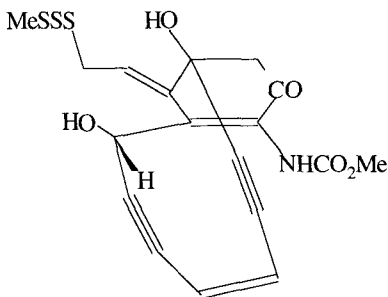
trait ondulé. L'addition d'un thiol réducteur amène alors la rupture des deux chaînes polynucléotides, sur l'une au niveau de la cytidine marquée par une flèche, et sur l'autre, au niveau d'un nucléoside non spécifié, situé deux unités nucléotides au-delà de l'adénosine, vers le côté 3'. Ces ruptures sont amorcées par l'arrachement d'un atome d'hydrogène du désoxyribose par le biradical **18.2** (x et y , électrons célibataires). On a pu le montrer directement avec un système plus simple pour la rupture au niveau de la cytidine. On a préparé par synthèse le « duplex » de dodécanucléotides **18.4**. L'unité cytidylique C est marquée en 5' sur le désoxyribose par du deutérium de la façon représentée par la formule partielle **18.5**. Après avoir fait réagir la calichéamicine sur le fragment d'ADN **18.4**, on recueille le produit de transformation **18.2** marqué par du deutérium sur la position x ($x = D$, $y = H$). Le carbone correspondant à x sur le système ène-diyne est donc celui qui se trouvait à proximité de la cytidine dans l'association de la double hélice avec la calichéamicine. D'autres expériences confirment que des protons non échangeables de l'ADN sont bien la source des hydrogènes introduits en x et y , mais elles ne permettent pas de définir leur emplacement sur les polynucléotides. Dans un tampon deutéré, la transformation de la calichéamycine, amorcée par le thiol deutéré $\text{DSCH}_2\text{COOCH}_3$, donne le composé **18.2** (20 %), avec plus de 98 % d'incorporation de deutérium aux positions x et y . La même expérience, en

présence d'ADN, donne **18.2** (65 %), avec uniquement de l'hydrogène à ces mêmes positions. Donc ces atomes d'hydrogène proviennent de sites non échangeables de l'ADN. La rupture après enlèvement d'un atome d'hydrogène en 5' conduit probablement à l'aldéhyde **18.6**, car le fragment restant perd un dérivé de la cytosine en milieu basique, sans doute par β -élimination.

Ce mécanisme général de la rupture ne fait pas intervenir explicitement le pseudo-oligosaccharide et l'aglycone seule devrait avoir les mêmes propriétés. On ne peut pas séparer celle-ci, la calichéamicinone **18.7**, de l'oligosaccharide sans la dégrader, mais on l'a obtenue sous forme racémique par une synthèse totale assez laborieuse^[4]. Cette synthèse est en dehors du cadre de notre livre. La calichéamicinone est effectivement capable de couper l'ADN en double hélice, mais de façon anarchique. D'autres différences de comportement entre le produit naturel et l'aglycone montrent que la partie pseudo-oligosaccharide a une grande importance. Nous les examinerons plus en détail au paragraphe 18.3, tandis que le paragraphe 18.2 commentera la synthèse du pseudo-oligosaccharide exceptionnel.



18.6

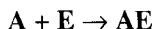
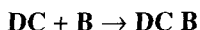
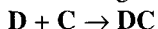


18.7

18.2 LES SYNTHÈSES DU PSEUDO-OLIGOSACCHARIDE DE LA CALICHÉAMICINE

18.2.1 Voie DCBAE^[4]

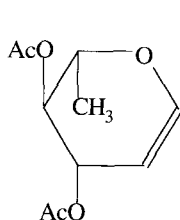
L'ordre d'assemblage est le suivant :



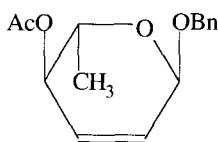
Les précurseurs des unités monosaccharidiques **ABDE** sont des dérivés de glycols, mais chacun est utilisé d'une façon différente. L'hydroxylamine substituée entre les résidus **A** et **B** est protégée sous forme de dérivé uréthane pour empêcher un réarrangement du résidu **A** que nous détaillerons plus loin. Le précurseur de

l'unité **D** est le di-*O*-acétyl-L-rhamnal **18.8**, qui donne le benryl glycoside **18.9** en présence d'alcool benzylique et de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ par réarrangement de Ferrier (voir le paragraphe 7.5.1). La fonctionnalisation définitive de **18.9**, pour donner **18.10**, demande quatre étapes, parmi lesquelles il y a une *bis* hydroxylation de la double liaison avec le réactif OsO_4 - *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde-eau. Après acétylation et débenzylation catalytique on active le sucre par conversion en trichloroacétimide **18.11**. Le précurseur du cycle **C** est le diiodophénol **18.12**, selon un schéma réactionnel suggéré auparavant^{[5] [6]}. Le couplage avec le trichloroacétimide **18.11** donne l' α -L-phényl glycoside **18.13**, en raison de la participation de la fonction acétate en 2. On remplace celle-ci par un groupement *ter*-butyldiméthylsilyle, puis on introduit le groupement méthoxycarbonyl en traitant le diiodophénol par un mélange de méthanol et de monoxyde de carbone, dans une réaction catalysée par l'acétate palladeux, en présence de la diphosphine $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2$ et de triéthylamine. Le dérivé méthoxycarbonyl **18.14** est ensuite transformé en chlorure d'acide, **18.15**. On a ainsi le fragment **CD** sous une forme prête au couplage ultérieur.

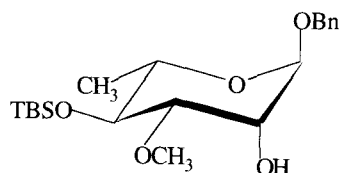
Le précurseur du résidu **B** est le glycal **18.16**. Celui-ci possède une fonction thiol protégée par un groupement dinitrophényl (DNP) et un hydroxyle protégé par un groupement *ter*-butyldiméthylsilyl. L'addition de l'hydroxylamine substituée $\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{OCONHOH}$ sur la double liaison, en présence de quantités catalytiques de Ph_3P . HBr donne l'uréthane **18.17**. On libère alors la fonction thiol, ce qui donne **18.18**, qui se condense sans difficulté sur le chlorure d'acide **18.15**. On arrive ainsi à une version protégée du fragment **DCB**, jusque et y compris l'atome d'azote, **18.19**.



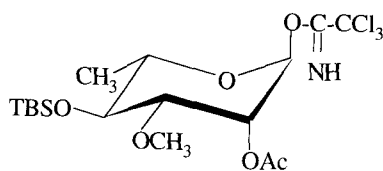
18.8



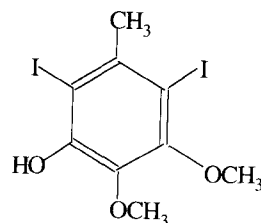
18.9



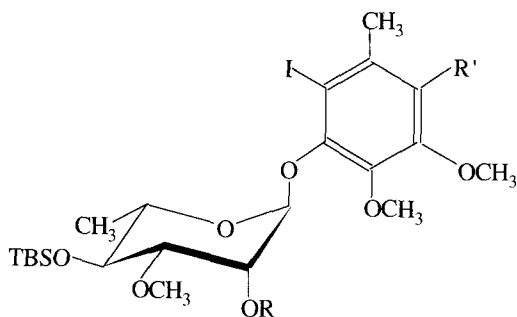
18.10



18.11



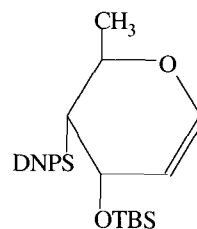
18.12



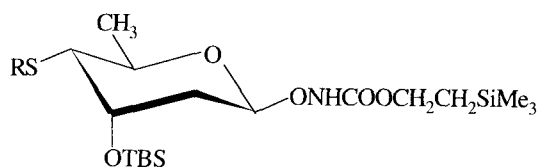
18.13 R = Ac, R' = I

18.14 R = TBS, R' = CO₂Me

18.15 R = TBS, R' = COCl

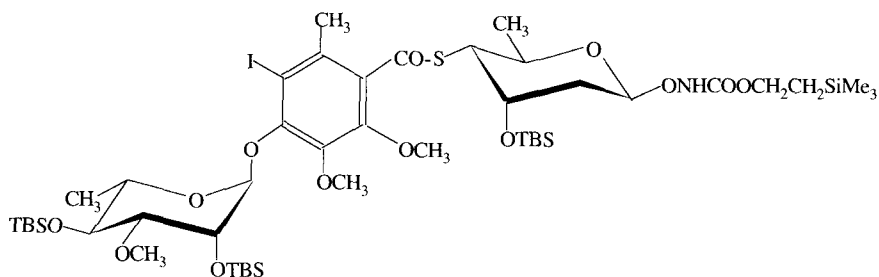


18.16



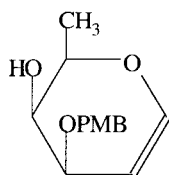
18.17 R = DNP

18.18 R = H

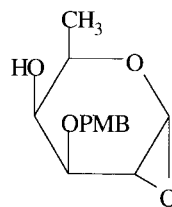


18.19

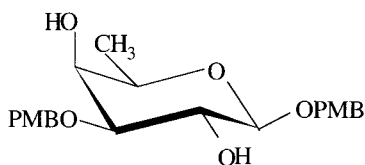
Le précurseur de l'unité A est le glycal **18.20**, préparé à partir du D-fucose, dont un hydroxyle est protégé par le groupement paraméthoxybenzyle (PMB). Le traitement par le 2,2-diméthyldioxirane donne l'oxirane **18.21** (un anhydride de Brigl), qui est très facilement converti en glycoside *trans*, **18.22**, par simple mélange avec l'alcool paraméthoxybenzylique à la température ambiante. Des deux hydroxyles libres de ce glycoside, seul l'équatorial est réactif dans le couplage consécutif.



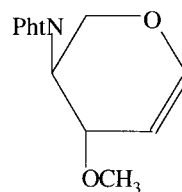
18.20



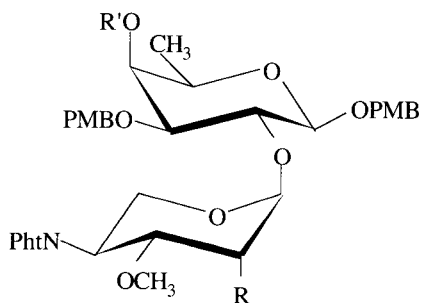
18.21



18.22



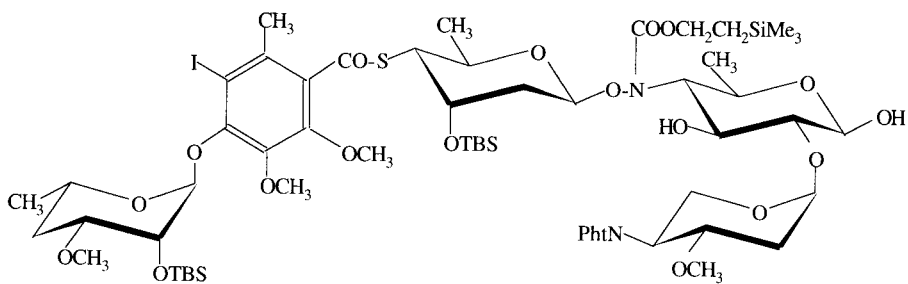
18.23



18.24 R = I, R' = H

18.25 R = R' = H

18.26 R = H, R' = Tf

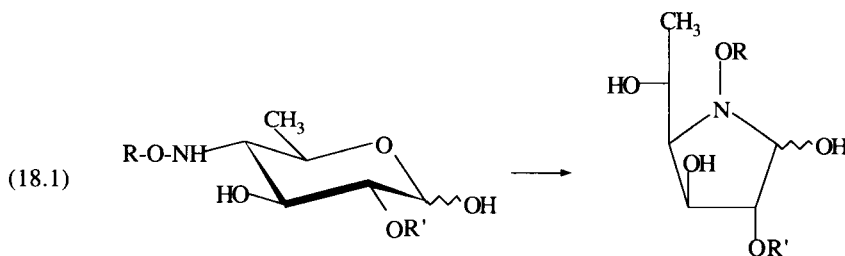


18.27

Le glycal **18.23** est le précurseur du résidu **E**. Il possède une fonction amine protégée par transformation en dérivé phtalimido (abrégé en Pht). Il se condense avec le glycoside **18.22** en présence du complexe $I^+ClO_4^-$ (*sym*-collidine)₂ pour donner le disaccharide **18.24**. L'iode est remplacé par de l'hydrogène par réduction avec le triphénylstannane. Sur ce composé, **18.25**, l'hydroxyle libre est activé par conversion en trifluorométhanesulfonate **18.26**. On a ainsi préparé le fragment **AE**.

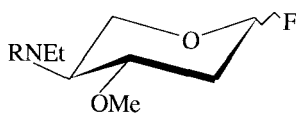
Le pont exceptionnel –N–O– entre les fragments **AE** et **DCB** est construit par réaction de ce trifluorométhanesulfonate **18.26** sur le sel de sodium de l'uréthane **18.19**, en solution dans la *N,N*-diméthylformamide. Il termine l'assemblage du pseudo-tétrasaccharide. L'enlèvement des groupements paraméthoxybenzyle par oxydation donne un produit encore partiellement protégé, **18.27** avec la fonction hémi-acétal libre pour le couplage éventuel à l'aglycone.

La protection de l'azote par dérivation en uréthane appelle quelques commentaires. L'unité **A** n'est stable que glycosylée. Si l'hydroxyle anomérique est libéré, cette unité se transforme en pyrrolidinose, selon la réaction (18.1). La dérivation en uréthane, inspirée d'un travail antérieur^[7], a une double utilité : la proximité du carbonyle facilite la déprotonation de l'azote et le 4-amino-4-déoxyhexose résultant de la libération de la fonction hémi-acétal est protégé sur l'azote, ce qui évite sa transformation en pyrrolidinose. Après engagement de l'hémi-acétal en liaison glycosidique, on effectue la déprotection de l'azote de l'hydroxylamine de façon pratiquement quantitative avec le fluorure de tétrabutylammonium.

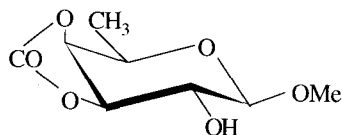


18.2.2 Voie EABCD^{[5], [6]}

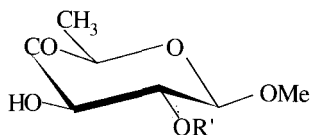
On prépare le précurseur **18.28** du résidu **E** à partir de la L-sérine. La fonction amine secondaire est protégée par dérivation en 9-fluorénylméthylcarbamate ($R = C_{13}H_9CH_2OCO$), que l'on peut éliminer dans des conditions alcalines modérées. Le couplage du fluorure de pyranosyle **18.28** avec **18.29** utilise $AgClO_4$ (2 équivalents) et $SnCl_2$ (2 équivalents) comme promoteurs ($\alpha/\beta = 4,5 : 1$). On obtient ainsi le fragment **AE**. On libère le système *cis*-diol, qui est oxydé sélectivement en hydroxy-cétone **18.30**. La liaison **BA** est alors réalisée par l'oximation de cette cétone par une glycopyranosylhydroxylamine, ce qui donne **18.31**. En raison de l'instabilité du résidu **A** non glycosidé déjà mentionnée, il faut conserver



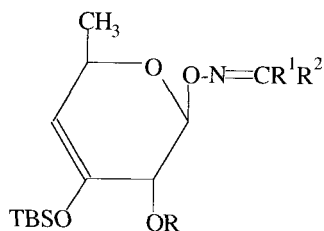
18.28



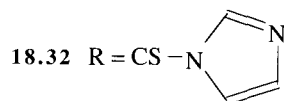
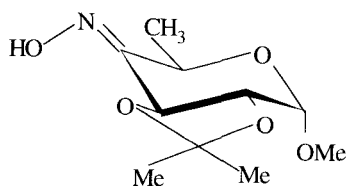
18.29



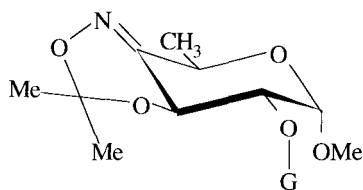
18.30



18.31 R = Aroyl

18.32 R = CS - N 

18.33



18.34

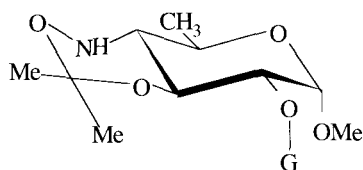
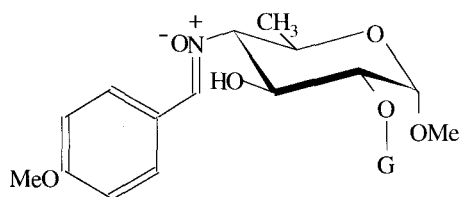
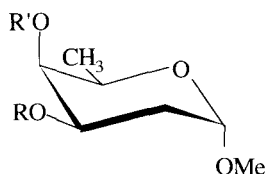
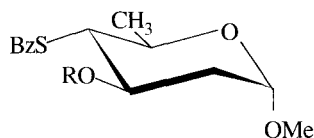
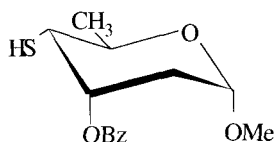
la fonction oxime jusqu'après le couplage. Elle est alors réduite par le cyanoborohydrure au pH 3. Pour en revenir à **18.31**, le produit a été préparé pour l'introduction du soufre en position 4 du trisaccharide **EAB**. On remplace le groupement aroyl par un thiocarbonylimidazole et le thionocarbonate **18.32** est isomérisée par thermolyse en thioester en 4 (98 %), par réarrangement sigmatropique 3,3. L'assemblage final a lieu comme dans la synthèse précédente, par couplage d'un chlorure d'acide lié au fragment **CD** au thiol libre lié à **EAB**.

18.2.3 Méthodes alternatives^{[8] [9] [10]}

La glycosidation de l'oxime **18.33** par un phényl pyranosyl sulfoxyde G-SO-Ph, en présence de triflate de triméthylsilyle a lieu sur O(2) avec isomérisation du cétal, donnant **18.34**. La réduction de **18.34** par le cyanoborohydrure donne uni-

quement la configuration α -D-glucosyl, **18.35**, hydrolysable en hydroxylamine libre. La nitrone **18.36** obtenue en traitant cette hydroxylamine par le para-anisaldéhyde est glycosidée par un halogénure de pyranosyle exclusivement sur l'oxygène (80 %).

Une voie d'accès simple à l'unité **B** part du glycal du D-fucose, qui donne le glycoside **18.37** par traitement au méthanol en présence d'acide. Celui-ci est silylé sélectivement en 3 par l'intermédiaire du stannylène, donnant **18.38**, puis converti en trifluorométhanesulfonate, **18.39**. On introduit le soufre en 4 avec inversion de configuration par substitution nucléophile avec PhCOSK, dans la *N,N*-diméthylformamide à 0°C (80 %), **18.40**. Après hydrolyse de l'éther silylique, on convertit **18.40** en trifluorométhanesulfonate **18.41**. La solvolysse par l'eau a lieu avec participation du groupement benzoyl, ce qui entraîne une inversion de configuration et une migration de benzoyl, pour donner la configuration souhaitée, **18.42**. Ces méthodes alternatives ont permis de préparer l'analogue du trisaccharide **ABE** présent dans l'espéramycine A₁^[10].

**18.35****18.36****18.37** R = R' = H**18.38** R = ter-BuSiMe₂, R' = H**18.39** R = ter-BuSiMe₂, R' = Tf**18.40** R = H**18.41** R = Tf**18.42**

18.3 RECONNAISSANCE DU PSEUDO-TÉTRASACCHARIDE PAR L'ADN

La réaction de la calichéamicine avec la double hélice de l'ADN se distingue de façon significative de celle de son aglycone isolée^[11].

18.3.1 Rupture de un ou deux brins

Le substrat est un ADN circulaire « super-enroulé », « forme I », où la double hélice est refermée sur elle-même par liaisons covalentes. L'un des ADN grand cycle utilisé était long de 9 000 nucléotides. La rupture d'un seul brin produit la « forme II », ou entaillée, et la rupture sur chaque brin, en des sites proches, la « forme III », linéaire (Fig. 18.2). On sait séparer et doser ces trois formes par électrophorèse sur gel. Avec la calichéamicine, en début de réaction, le rapport rupture de deux brins sur rupture d'un seul brin est 1:2. Avec la calichéamicinone, ce rapport tombe à 1:30 ; la rupture d'un seul brin prédomine.

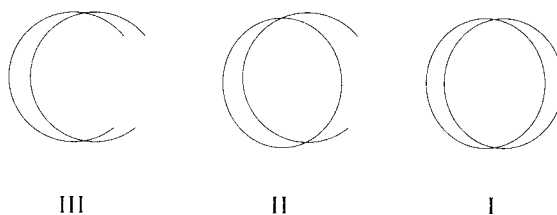


Figure 18.2 Représentation schématique des formes I, II et III de l'ADN.

18.3.2 Efficacité comparée

Le même substrat et la même technique permettent de comparer l'efficacité de la calichéamicine et de son aglycone séparée. En présence d'un thiol réducteur, la calichéamicine produit déjà une dégradation importante à la concentration 0,7 nM. A la concentration 1,5 μ M, il ne subsiste plus que des petits nucléotides. La calichéamicinone produit une rupture observable à la concentration 13 μ M.

18.3.3 Spécificité du site d'attaque

On a reconnu d'emblée que la rupture de chaîne par la calichéamicine avait lieu au niveau de certains enchaînements de tétranucléotides comme TCCG, TCCT, GCCT. Pour étudier ceci on a préparé par synthèse le polynucléotide **18.43**, à 53 paires de bases, dont on n'a représenté que l'un des brins. Ce polynucléotide

5'-TTTAACCGATCAGAATTCCGGTGCATGCTCCTAAGTGACGCCTAAGCTTCTT

incorpore les sites présumés d'attaque, soulignés par des caractères gras. Il a été marqué radioactivement sur les deux brins de son extrémité 3', par un procédé que nous ne détaillerons pas ici. Après la rupture, les morceaux sont séparés par électrophorèse sur gel et repérés par radioautographie. On observe effectivement les morceaux correspondant à la rupture au niveau TCCT, mais les autres points de fragmentation ne s'interprètent pas aussi facilement. Dans d'autres expériences^[12], avec un autre type d'enchaînement polynucléotidique, on a observé des fragmentations préférentielles à d'autres niveaux, ainsi aux séquences 5'TTCA ; 5'TTTT ; 5'TTGT. Dans les deux cas, les coupures préférentielles limitent le nombre de polynucléotides de rupture et l'électrophorèse sur gel ne révèle qu'un petit nombre de composés. Par contre, la rupture est anarchique avec l'aglycone et ceci se traduit par la présence d'un grand nombre de taches d'intensité uniforme.

18.3.4 Conclusion

Ces résultats suggèrent une relation de reconnaissance entre certains enchaînements nucléotidiques de la double hélice et le pseudo-oligosaccharide. Celui-ci interviendrait pour acheminer l'aglycone réactive vers un site particulier et, peut-être aussi, en ce site, lui donner l'orientation précise la plus favorable à la rupture double brin. Une estimation grossière suggère que l'affinité de la calichéamicine pour la double hélice est de l'ordre de trois ordres de grandeur plus élevée que celle de la calichéamicinone. Le méthyl glycoside du pseudo-oligosaccharide, en occupant un site particulier sur la double hélice, le protège contre des agressions extérieures, par exemple la coupure par la calichéamicinone^[13] et la désoxyribonucléase, enzyme de dégradation hydrolytique générale de l'ADN^[14]. On peut se demander quels sont les éléments fondamentaux dans la structure du pseudo-oligosaccharide. Il y a quelques résultats suggestifs : la spécificité de la coupure reste inchangée si on supprime les résidus **D** ou **E**. Par contre, la calichéamicine **T**, produit artificiel où ne restent plus que les sucres **A** et **E**, n'agit qu'à une concentration beaucoup plus élevée que le produit naturel, et de façon non sélective. Un problème en suspens est celui de la capacité de reconnaissance du noyau aromatique. Il est maintenant certain que l'atome d'iode joue un grand rôle dans l'interaction^[15].

RÉFÉRENCES

- [1] M. D. Lee et collaborateurs, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 985-997.
- [2] J. Golik et collaborateurs, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3461-3464.
- [3] M. D. Lee, G.A. Ellestad et D.B. Borders, *Acc. Chem. Res.*, 24 (1991) 235-243.
- [4] R. L. Halcomb, S. H. Boyer et S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31 (1992) 338-342.
- [5] K. C. Nicolaou et collaborateurs, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 8193-8195
- [6] K. C. Nicolaou et collaborateurs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31 (1992) 340-342.

- [7] D. Yang, S. H. Kim et D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 4715 -4716.
- [8] T. Bamhaoud, J.-M. Lancelin et J.-M. Beau, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1992) 1494-1496.
- [9] F.Y. Dupradeau, S. Allaire, J. Prandi et J.-M. Beau, *Tetrahedron Lett.*, 34 (1993) 4513-4516.
- [10] E. Da Silva, J. Prandi et J.-M. Beau, *J. Chem Soc., Chem. Comm.*, (1994) 2127-2128.
- [11] J. Drak, N. Iwasawa, S. Danishefsky et D. M. Grothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 7464-7468.
- [12] D. Kahne et coll., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 4608-4612.
- [13] J. Aiyar, S.J. Danishefsky et D.M. Grothers, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 7552-7554.
- [14] K.C. Nicolaou et coll., *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 7555-7557.
- [15] Tianhu Li et coll., *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 3709-3715.

Index

Cet index ne fait pas double emploi avec la table des matières et nous conseillons de consulter celle-ci en priorité. La majorité des composés cités dans le livre ont été indexés. Nous avons utilisé le nom d'usage courant au laboratoire, par exemple, *N*-acétylglucosamine, chaque fois que possible. Les autres produits sont classés par configuration. Les noms donnés sont ceux de la nomenclature officielle, à ce détail près que le descripteur de configuration devrait *suivre* et non précéder les termes de substitution.

A

Acétimidates, 162-163
 Acétoxyoxanes, énergies libres conformationnelles, 27
N-Acétylgalactosamine, 6
N-Acétylglucosamine, 6
N-Acétyllactosamine
 synthèse chimique, 157
 synthèse enzymatiques, 171, 175
N-Acétylmannosamine, 6
 Acide *N*-acétylneuraminique (voir aussi chapitre 12), RMN du proton, 24, 25, 198
 9-*O*-acétyl
 dans les oligosaccharides des mélanomes et du cerveau embryonnaire du rat, 273
 synthèse enzymatique, 202
 Acides aminés de la jonction sucre-protéine, 217
 Adénosine, 67
 diphosphate, 85-86
 triphosphate, 85-86
 Adhésion (molécules d'), 275
 Agarose, 171
 Agglutinines froides, 258
 α -D-Allofuranose
 3-azido-1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, 110
 1,2 ; 5,6-di-*O*-cyclohexylidène-3-*C*-méthyl, 120
 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène-3-*O*-tosyl, 110
 α -D-Allopyranoside
 méthyl, complexation de Ca^{++} , 180
 méthyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy, 117

 méthyl 2,3-anhydro-4,6-*O*-benzylidène, 113
 α -D-Allopyranosyl- α -D-allopyranoside, complexe calcique, 179
 Altona-Sundaralingam (convention), 42
 α -D-Altropyranoside, méthyl 3,4-anhydro, isomérisation, 114
 Amylopectine, 187
 Anticorps
 catalytiques, 243
 monoclonaux, 239
 polyclonaux, 238
 Antigènes
 19.9, et diagnostic du cancer, 272
 A périodique, 255-256
 dans le développement embryonnaire, 273-274
 Forssman, 273
 P, 256
 SSEA-1, 274
 sur les cellules cancéreuses, 272
 T, 255-256
 Antithrombine III, association au site actif de l'héparine, 268
 Apiose, 120
 β -D-Arabinopyranosyle, chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 Autoimmunes (maladies), 258
 Azidonitration, 164

B

Benzoquinone, 2,3-dichloro-5,6-dicyano, 81
 Bismuth, diacétyltriphényl, 82
 Butane, conformation, 28

C

- Calichéamycine γ_1^I , 280
- Calichéamycinone, 280
- Céramide, 213
- Chiron (méthode), 133
- Chitine, 264-265
- Chondroïtine, 223
- Chromatographie
 - d'affinité
 - d'héparine et de son site actif, 269
 - des lectines, 245-246
 - d'exclusion, sur gel, pour l'antithrombine III, 269
 - sur couche mince pour les néoglycolipides, 276
 - sur échangeur d'anions, pour isoler l'héparine, 266
 - sur échangeur de cations
 - en plaques, 179
 - sur colonne préparative, forme Ca^{++} , 12, 181
- Claisen, réarrangement, 124-125
- Couplage $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$, et effet anomérique, 35
- Cycloaddition, paramètres thermodynamiques en phase aqueuse, 195
- Cyclohexanone, 2,3,4-tribenzoyloxy-5-hydroxy, 120
- Cyclopentadiénylтитан, trichlorure, 127
- Cytidine, 67
 - diphosphate, 206-207
 - 5'-monophosphate, 206-207
 - 5'-monophosphosialic acid, 205-206
 - 5'-monophosphosialic acid synthétase, 205-206
 - triphosphate, 206-207

D

- Dermatane sulfate, 223
- Désoxyadénosine, 67, 281
- Désoxycytidine, 67, 281
- Désoxyguanosine, 67, 281
- Désoxyribose, 8
 - composition tautomérique dans l'eau, 15
- Déterminant antigénique (voir aussi épitope), 240
- Diméthoxyméthane, conformation, 35
- Diméthyldioxirane, dans l'époxydation des glucals, 53
- Diméthylsulfoxonium méthylure, 122
- Dithiane, 121

E

- Electrophorèse
 - mobilité des cations complexés, 180
 - sur papier, 179
- Endoglycosidases, 147-148
- Epimérase, 170-171
- Épitope, 240
- D-Erythrose, 94

F

- Fischer, convention, 6-8
- FK 506, diverses représentations, 134
- Fonction de distribution radiale de l'eau, 182
- α -D-Fructofuranose 1,6-diphosphate
 - biosynthèse, 19
 - composition tautomérique dans l'eau, 15
- β -D-Fructopyranose 1,2 : 1',2'-dianhydride, complexes métalliques, 179
- β -D-Fructopyranoside, méthyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
- β -D-Fructopyranosylamine, *N*-aryl, 65
- D-Fructose, 7
 - composition du mélange de méthanolysé acide, 47
 - composition tautomérique dans l'eau, 15
 - dichroïsme circulaire, 13
- D-Fructose, 1-déoxy
 - composition tautomérique dans l'eau, 15
 - dichroïsme circulaire, 13
- α -L-Fucp- (1-2)- β -D-Galp -(1-4)- α -D-GlcNAc-(1-OBn), dérivé partiellement protégé, 260
- α -L-Fucopyranose, tri-*O*-benzyl, 62
- α -L-Fucopyranoside, méthyl, RMN du proton, 24, 25
 - tri-*O*-benzyl, 62
 - vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
- α -L-Fucopyranosyle
 - bromure, tri-*O*-benzyl, dans la synthèse des trisaccharides Le^a et B, 259
 - chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
- L-Fucose, 7
 - composition du mélange de méthanolysé acide, 47
- Fucosyltransférase, 173
 - α -1,2, 174
 - α -1, 3/4, 174
- Fürst-Plattner, règle, 113

G

- D-Galactal
 conversion en talose, 118-119
 tri-*O*-acétyl, azidonitration, 164
- α -D-Galactofuranoside, méthyl, 45
- β -D-Galactofuranoside, méthyl, préparation, 48
- α -D-Galactopyranose, 1,2 : 3,4-di-*O*-isopropylidène
 6-déoxy, 95
 préparation, 87
 RMN et conformation, 26
 6-*O*-tosyl, 95, 110
- α -D-Galactopyranoside
 aryl, comme galactosylant enzymatique, 61
 comme accepteur enzymatique, 61
 méthyl, 45
 méthyl 4-*O*-benzoyl-6-bromo-6-déoxy, 88
 méthyl 4,6-*O*-benzylidène, 88
 méthyl 3,4-*O*-isopropylidène, 87
 paranitrophényl, comme galactosylant enzymatique, 175
 vitesse d'hydrolyse acide à 100°C, 56
- β -D-Galactopyranoside
 benzyl, 84
 benzyl, 2-acétamido-2-déoxy, préparation, 111
 benzyl, 3-*O*-allyl-2,4-di-*O*-benzyl, 261
 benzyl, 3-*O*-benzyl, 84
 benzyl, 2,6-di-*O*-benzyl, 91
 méthyl, 45
 RMN du proton, 23, 25
 méthyl 3-*O*-allyl-2,4,6-tri-*O*-triflyl, substitution, 109
 paraméthoxybenzyl, 6-déoxy-3-*O*-paraméthoxybenzyl, 286
- α -D-Galactopyranosyle
 bromure, 6-*O*-acétyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl, couplage, 167
 bromure, tétra-*O*-acétyl, préparation et couplage, 49-50, 167
 bromure, 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-déoxy, couplage, 260
 chlorure, tétra-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 nitrate, 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-déoxy, 164
- β -D-Galactopyranosyle
 chlorure, tétra-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
- chlorure, 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-azido-2-déoxy, 164
 phénylsulfoxyde, tétra-*O*-benzyl, couplage, 166
- D-Galactose, 6
 adaptation à l'eau, 193
 composition du mélange obtenu par méthanolyse acide, 47
 composition tautomérique dans l'eau, 15
 dichroïsme circulaire, 13
 2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl, 148
- α -Galactosidase, en couplage osidique, 175
- β -Galactosidase, de *B.circulans*, en couplage osidique, 175
- Galactosyltransférase, 169-171
- α -D-Galp-(1-3)- α -D-Galp-(1-OMe), synthèses enzymatiques, 61, 175
 hepta-*O*-benzyl éther, synthèse, 166
- β -D-Galp-(1-4)- β -D-GlcNAcp-(1-6)-[β -D-GlcNAcp-(1-3)]- β -D-Galp-(1-4)- β -D-Glc-(1-OMe)
 préparation, 172
 RMN du proton, 155
- Gangliosides, des granulocytes, spectrométrie f.a.b., 151
- Globoside, 256
- D-Glucal, 119
 2-acétoxy-3,4,6-tri-*O*-acétyl, 135
 tri-*O*-acétyl, 119
 tri-*O*-benzyl, époxydation, 53
- D-Glucitol
 1,3 ; 2,4 ; 5,6-tri-*O*-benzylidène, 87
 1,2 ; 3,4 ; 5,6-tri-*O*-isopropylidène, 88
- α -D-Glucofuranose, 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, 87
 alcoolate avec le chlorocyclopentadiényltitane, 127
 3-azido-3-déoxy, 109
 3-*O*-(*trans*-butadiényl), cycloaddition, 130
 3-*O*-imidazyl, substitution, 110
 3-*O*-tosyl, inertie, 110
- α -D-Glucofuranose, 1,2-*O* isopropylidène, complexe avec le periodate, 92-93
- β -D-Glucofuranoside, éthyl, hydrolyse, 56
- α -D-Glucopyranose
 2-acétamido-1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-déoxy, 162
 1,2-anhydro, préparation, conversion en glycoside, 53

- β -D-Glucopyranose
 2-acétamido-1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-déoxy, 162
 3-*O*-acétyl-1,6-anhydro-2-azido-2-déoxy, dans la synthèse du site actif de l'héparino, 270
 1,6-anhydro, 52
 1,6-anhydro-2-*O*-tosyl, conversion en époxyde, 112
 penta-*O*-acétyl, 116
 conversion en bromure, 49
 en glycosidation, 49, 161
 hydrolyse sélective, 83
 isomérisation avec SbCl₅, 116
 1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-bromo-2-déoxy, substitution radicalaire, 124
 D-Glucopyranose, 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl, 83
 α -D-Glucopyranoside
 benzyl 6-*O*-acétyl-3-*O*-benzyl-2-benzyl-oxycarbonylamido-2-déoxy, dans la synthèse du site actif de l'héparine, 270
 benzyl 2,3,6-tri-*O*-benzyl, *trans* butadienyl ether, cycloaddition, 129
 méthyl, 48
 cinétique de l'hydrolyse à 100°C, 56
 méthyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy-3-*O*-mésyl, conversion en dérivé *allo*, 117
 méthyl 4,6-*O*-benzylidène, 87
 méthyl 4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-tosyl, conversion en oxirane, 112
 méthyl 2,3 ; 4,6-di-*O*-cyclohexylidène, 88
 méthyl tétra-*O*-acétyl, 51
 méthyl 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-bromo-2-déoxy, 119
 méthyl 6-*O*-trityl, 81
 phényl, cinétique de l'hydrolyse à 100°C, 56
 phényl tétra-*O*-acétyl, 51
 β -D-Glucopyranoside
 benzyl 2-acétamido-3-*O*-acétyl-2-déoxy-4,6-di-*O*-mésyl, inversion de configuration, 111
 benzyl 2-acétamido-4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy, glycosidation, 167
 benzyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-imidazyl, réaction SN2, 111
 benzyl 4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy-2-phtalimido, glycosidation, 167
 ter-butyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 éthyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 méthyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 méthyl 2-acétamido-2-déoxy, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 méthyl 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-chloromercuri-2-déoxy, 119
 méthyl 2-amino-2-déoxy, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 méthyl 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène, 89
 méthyl 2,3,6-tri-*O*-benzyl, 89
 paranitrophényl, hydrolyse chimique et enzymatique, 58
 phényl tétra-*O*-acétyl, préparation, 51
 conversion en 1,6-anhydro, 52
 phényl tétra-*O*-benzyl, 89
 triméthylméthyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 β -D-Glycopyranosylamine et dérivés *N*-substitués, 63
 2-acétamido-tri-*O*-acétyl-2-déoxy, amide avec l'acide aspartique, 64
 α -D-Glucopyranosyle
 bromure, tétra-*O*-acétyl, conversion en acétoxylglycal, 135
 en glycosylation, 161
 bromure, 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-bromo-2-déoxy, 119
 chlorure, 2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-déoxy, 64, 162
 chlorure, tétra-*O*-acétyl, 116
 en glycosylation, 161
 RQN de ³⁵Cl et conformation, 33-34
 fluorure, 4-*O*-acétyl-2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-(*ter* butyldiphénylsilyl), en glycosidation, 164
 phosphate, 170
 phosphate, tétra-*O*-acétylé, 86
 β -D-Glucopyranosyle
 azoture, 2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-déoxy, 64
 chlorure, tétra-*O*-acétyl, isomérisation en dérivé *ido*, 116
 chlorure, tri-*O*-acétyl-2-déoxy-2-phtalimido, 162
 phosphate, tétra-*O*-acétyl, 86
 RQN de ³⁵Cl, 33-34
 D-Glucose, 6
 adaptation à l'eau, 192-193
 aldéhyde, hydraté, 10

composition du mélange de glycosida-
tion, 47
composition tautomérique dans l'eau,
15
dichroïsme circulaire, 13
2,3 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, diméthyl
acétal, 158-159
5,6-di-*O*-méthyl, dichroïsme circulaire,
13
mutarotation, 4
2,3,6-tri-*O*-méthyl, 148
6-phosphate, 85-86
RMN du proton, 5
[1-¹³C]-D-Glucose, RMN de ¹³C des tau-
tomères, 14
D-Glucuronique (acide)
benzyl β-D-pyranoside, 2-benzyloxycar-
bonylamido-2-déoxy, 93
α-D-furanose, méthyl ester, 3-*O*-benzyl-
1,2-*O*-isopropylidène, 270
Glucuronosides, synthèse enzymatique,
174
D-Glycéraldéhyde, 6
2,3-*O*-isopropylidène, 94
Glycerol, tripalate et pivaloyloxonium,
115
Glycosidases, 59
Glyoxylique (acide), ester butylique,
cycloaddition, 129-130
GM1, 214, 215
Groupes sanguins
A, épitope trisaccharidique, 254
A₁, A₂, sous-groupes, 257
B, épitope trisaccharidique, 254
O, et déterminant H, 253,254
Guanosine, 67
diphosphate, 174
diphosphate-fucose, 173
triphosphate, 174

H

Hamamélose, 120, 121
Hématoside, 214, 215
α-D-*glycéro*-α-D-*gulo*-Heptopyranoside,
méthyl, complexe calcique, 177-178
α-D-*érythro*-Hex-2-énopyranoside, *ter*-
butyl 2,4,6-tri-*O*-acétyl-3-déoxy, 136
D-*érythro*-Hex-2-énopyranoside, 4,6-di-*O*-
acétyl-2,3-didéoxy, 119
β-D-*xylo*-Hex-5-énopyranose, 1,2,3,4-
tétra-*O*-benzoyl-6-déoxy, 120

α-D-*ribo*-Hexofuranose, 3-déoxy-1,2 ;
5,6-di-*O*-isopropylidène, 95
Hexokinase, 86
β-D-glucopyranose,
1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-*C*-allyl, synthè-
se radicalaire, 124
1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-2-bromo-2-
déoxy, substitution radicalaire, 124
α-D-*altro*-Hexopyranoside, méthyl 4,6-*O*-
benzylidène-2-déoxy-2-*C*-méthyl, 123
α-D-*érythro*-Hexopyranoside, méthyl 3-*O*-
benzoyl-6-*O*-*ter*-butyldiphénylsilyl-4-
C-méthoxycarbonylméthylène-2,4-
didéoxy, 122
α-D-*arabino*-Hexopyranoside, méthyl 2-
déoxy, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
α-D-*ribo*-Hexopyranoside
méthyl 2-*C*-acétyl-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-
benzylidène-3-déoxy, 123
méthyl-2-*C*-acétyl-4,6-*O*-benzylidène-
2,3-didéoxy, 123
α-D-*lyxo*-Hexopyranoside, méthyl 3,6-
didéoxy, 114
α-D-*ribo*-Hexos-3-ulofuranose, 1,2 ; 5,6-
di-*O*-cyclohexylidène, 120
1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, 91
α-D-*érythro*-Hexos-3-ulopyranoside,
méthyl 4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy, 89
α-D-*érythro*-Hexos-4-ulopyranoside,
méthyl 3-*O*-benzoyl-6-*O*-*ter*-butyldi-
phénylsilyl-2-déoxy, 122
β-D-*érythro*-Hexos-2-ulopyranoside, 3,4-
O-isopropylidène, conversion en
hamamélose, 121
α-D-*ribo*-Hexos-3-ulopyranoside, méthyl
4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-tosyl, 91
β-D-*xylo*-Hexos-4-ulopyranoside, benzyl
2,6-di-*O*-benzyl, 91
Hyaluronique (acide), 223
Hybridomes, 239, 271
Hydratation hydrophobe, 184
Hypophosphoreux (acide), 95

I

α-L-Idofuranuronate, méthyl, 3-*O*-benzyl-
1,2-*O*-isopropylidène, 270
α-L-Idopyranose, conformation, 40
pentaacétate, conformation, 41
β-D-Idopyranose, 1,6-anhydro, prépara-
tion et configuration, 51-52

α -L-Idopyranosiduronique (acide), conformation des résidus dans les glycosaminoglycanes, 40
 α -D-Idopyranosyle, chlorure tétra-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 D-Idose, tétraacétate, synthèse, 116
 Imidazole
 N-benzoyl, 83
 thiocarbonyl (*bis*), dans la préparation des thionocarbonates, 139
 Imidazolylsulfonates, 108
 Immunoglobulines, 236-238
 Immunoglobulines IgG₁, décacaccharide et conformation, 221-222
 Indole-glycérol, 3'-phosphate, 66
 Inositol (*cis*), électrophorèse, 179

K

KDN, 200-201
 Kératane sulfate, 224

L

Lactobionique (acide), 157
 Lactosaminide, 2,2,2-trichloréthyl, dérivé partiellement protégé dans la synthèse du trisaccharide Le^a, 259
 Lactose
 allylation régiosélective, 158-159
 dégradation, 157
 oxydation, 157
 tri-*O*-isopropylidène, diméthyl acétal, 159
 Lactotransférine humaine, dodécasaccharide-asparagine, 232-233
Lathyrus Ochrus, lectine, structure aux rayons X, 232
 Lemieux-Karplus (courbe de), relative au couplage $^3J_{\text{C-H}}$, 145
 Lévilinique (acide), par traitement acide du désoxyribose, 47
 L2/HNK-1, 211
 Longueurs de liaisons
 dans le glucose, 30
 en relation avec l'effet anomérique, 30
 D-Lyxal, 6-déoxy-3-*O*-méthoxybenzyl, 286

M

Maltose, structure à l'état solide, 231
 Mannitol, 1,2 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, 94

β -D-Mannofuranose, complexe calcique, 178
 2,3 ; 5,6-di-*O*-isopropylidène, ramification, 125
 oxime, 131
 2-*C*-hydroxyméthyl-2,3 ; 5-6-di-*O*-isopropylidène, 125
 β -D-Mannofuranoside, méthyl, 48
 α -D-Mannopyranose, 2,3-anhydro-4,6-*O*-benzylidène, 112
 β -D-Mannopyranose, 1,6 ; 2,3-*bis*-anhydro, 112
 α -D-Mannopyranoside
 méthyl 2,3-anhydro, isomérisation, 114
 méthyl, 2,3-anhydro-4,6-*O*-benzylidène, 112
 méthyl, 2,3 ; 4,6-di-*O*-benzylidène, 89
 α -L-Mannopyranoside
 aryl, 285
 benzyl, 284
 4-*O*-*ter*-butyldiméthylsilyl-6-déoxy-3-*O*-méthyl, 284
 6-déoxy-2,3-*O*-isopropylidène, glycosylation, 167
 β -D-Mannopyranoside, préparation, 50
 benzyl, 2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-déoxy, dans la préparation des dérivés de la *N*-acétylmannosamine, 111
 2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène, par inversion sur C(2), 165
 méthyl, 3-*O*-allyl-2,4,6-tri-*O*-benzoyl, 109
 α -D-Mannopyranosyle
 bromure, 6-*O*-acétyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl, 165
 bromure, 3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-bromo-2-déoxy, 119
 chlorure, tétra-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 phosphate, 174
 α -L-Mannopyranosyle
 trichloracétimide, 4-*O*-*ter*-butyldiméthylsilyl-6-déoxy-3-*O*-méthyl, 284
 β -D-Mannopyranosyle
 chlorure, tétraacétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 Mannosamine, *N*-acétyl, représentation Fischer, 6
 D-Mannose, 6
 composition du mélange obtenu par méthanolyse acide, 47

composition tautomérique dans l'eau, 15
 dichroïsme circulaire, 13
 Mésoxalate d'éthyle, cycloaddition, 130
 Méthoxyéthane, conformation, 28
 Méthoxymercuration (des glycols), 118
 Méthyl chlorométhyl éther
 conformation à l'état gazeux, 30
 constantes physiques, 30
 orbitales moléculaires, 32
 Mutarotase, 19

N

Néoglycolipides, préparation par chromatographie, 276
 α -D-Neu5Acp-(2-3)- β -D-Galp-(1-3)-GlcNAc, synthèse enzymatique, 208
 α -D-Neu5Acp--(2-6)- β -D-Galp-(1-4)- β -D-GlcNAcp-(1-2)- α -D-Manp-(1-OMe), synthèse enzymatique, 208
 α -D-Neu 5Acp-(2-3)- β -D-Galp (1-4)-Glc, synthèse d'un dérivé protégé par coupure, 204-205
 α -D-Neu 5,9 Ac₂p -(1-6)- β -D-Galp- (1-4)-GlcNAc, synthèse enzymatique, 208
 Neuraminidases, 200
 Nicotinamide adénine diphosphate, 174
 Nitrate cérique ammoniacal, 81
 Nucléotides-sucres, généralités, 173

O

Overhauser (effet), 185
 Oxane
 2-chloro, conformation, effet anomérique, 31
 orbitales moléculaires, 36
 2-chloro-4-méthyl, équilibre *cis-trans*, 31
 cis-2,5-diméthyl, conformation, 29
 2-hydroxyméthyl, énergie libre conformationnelle, 29
 méthyl, énergies libres conformationnelles, 29
 Oxyde de dibutylétain, 84

P

α -D-*ribo*-Pentodialdo-1,4-furanoside, méthyl 2,3-*O*-isopropylidène, 91
 α -D-*érythro*-Pentofuranose, 5-*O*-benzoyl-3-déoxy-1,2-*O*-isopropylidène-3-*C*-méthylène, 121

α -D-*érythro*-Pentopyranoside, méthyl 2-déoxy, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 Peptide-N⁴-(*N*-acétyl- β -glucosaminy) asparagine amidase F, dans l'étude de la thyroglobuline porcine, 153
 Pfitzner et Moffat (réaction d'oxydation), 89
 Phosphénolpyruvique (acide), 86, 170
 Polymorphisme (des antigènes de groupe sanguin) 254
 Polysialiques (acides)
 dans *Escherichia Coli K1*, 210
 dans les étoiles de mer, 209
 dans *Neisseria meningitidis*, 209
 immunochimie, 209-210
 Promoteurs de glycosidation, 160, 161, 162
 Pseudorotation, 42
 Pyruvate kinase, 86, 170

R

Réacteur membranaire, 175
 Réactions croisées, 243
 L-Rhamnal, di-*O*-acétyl, 284
 α -L-Rhamnopyranosyl, chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ³⁵Cl, 34
 D-Ribofuranosyle, chlorure, tri-*O*-acétyl, 68
 D-Ribonic (acide), 1-4-lactone, 139
 β -D-Ribopyranose, tétra-*O*-acétyl, RMN du proton et conformation, 37
 β -D-Ribopyranoside, méthyl, vitesse d'hydrolyse à 100°C, 56
 β -D-Ribopyranosylamine, préparation, 68
 2,3-*O*-isopropylidène, 68
 β -D-Ribopyranosyle, chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ³⁵Cl, 34
 D-Ribose, 6
 composition du mélange obtenu par méthanolyse acide, 47
 composition tautomérique en solution aqueuse, 15
 dichroïsme circulaire, 13
 5-phosphate, 65
 Ribosylimidazole, 69

S

Saccharose, 53
 Sélectines (ligands des)
 sialylé, 3'-sialyl-Lewis^a, 278
 sialylé, 3'-sialyl-Lewis^x, 278

- sulfaté, pentasaccharide, 152, 278
 sulfaté, tétrasaccharide, 277
- Série D,
 définition, 7
 nomenclature, 9
 origine naturelle, 8
- Sialosides, hydrolyse acide, 57
- Sialylaldolase
 préparation de Neu5Ac et analogues, 202
 spécificité, 202-203
- Sialyltransférases, 206, 207
- Silane
ter-butylchlorodiméthyl, 82
ter-butylchlorodiphényl, 82
- Sphingosine, 213
- Stabilité (constantes de)
 complexes de la cyclodextrine, 185
 complexes des sucres, 181
- Stérodiffférenciation, 167-169
- T**
- α -D-Talopyranoside, méthyl 2,3-anhydro-6-déoxy, réduction, 114
- D-Talose, adaptation à l'eau, 193
 préparation, 118
- Thymidine, 67, 281
- Thyroglobuline porcine, étude par RMN, 153-155
- Tréhalose, 141
- Trichloroacétimides, 162-163
- Trifluoracétylyse, 219
- Trifluorométhanesulfonates, 108
- Triphénylchlorométhane, 81
- Triphénylstannane, 124
- U**
- Ugi (réaction), 132
- Uridine, 67
- Uridine diphosphate, 170
- Uridine-diphosphate-galactose, 170
- Uridine-diphosphate-glucose, 170
- Uridine triphosphate, 170
- V**
- Vorbrüggen (méthode), synthèse des nucléosides pyrimidiques, 68
- W**
- Wittig (réaction), 121
- Wittig-Horner (réaction), 122
- X**
- Xylobiose, 4-thio, 169
- α -D-Xylofuranose,
 3-*O*-acryloyl-1,2-*O*- isopropylidène-5-*O*-triméthylsilyl, cycloaddition, 130
 5-*O*-benzoyl-3-*C*- hydroxyméthyl-1,2-*O*-isopropylidène, 121
 5-*O*-benzoyl-1,2-*O*-isopropylidène-3-*C*-tosyloxyméthyl, 121
 1,2-*O*-isopropylidène-3-*C*-méthyl, 121
- β -D-Xylopyranose
 tétra-*O*-acétyl, conformation, 39
 tétra-*O*-benzoyl, conformation, 39
 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio, 169
- α -D-Xylopyranosyle, chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
- β -D-Xylopyranosyle, chlorure, tri-*O*-acétyl, RQN de ^{35}Cl , 34
 chlorure, tri-*O*-benzoyl, conformation, 39
 conformation, 39
 fluorure, tri-*O*-acétyl, conformation, 22, 39
 fluorure, tri-*O*-benzoyl, conformation, 35, 39