

ORSAY
n° d'ordre :
1 806

20 k
/

T H E S E

PRESENTEE A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES (CHIMIE)

par

Jean-Louis DANAN

Sujet de la thèse :

SYNTHESES DE GLYCERIDES ET DE GLYCEROPHOSPHOLIPIDES
MARQUES AU CARBONE 14.

soutenue le 23 Mars 1977 devant la Commission d'Examen :

MM.	S. DAVID	Président
	P. PICHAT	Rapporteur
	H. KAGAN	
	J. POLONOVSKI	Examineurs
	M. VILKAS	

ORSAY
n° d'ordre :
1 806

T H E S E

PRESENTEE A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES (CHIMIE)

par

Jean-Louis DANAN

Sujet de la thèse :

SYNTHESES DE GLYCERIDES ET DE GLYCEROPHOSPHOLIPIDES
MARQUES AU CARBONE 14.

ST4 13933

soutenu le 23 Mars 1977 devant la Commission d'Examen :

MM. S. DAVID	Président
P. PICHAT	Rapporteur
H. KAGAN	
J. POLONOVSKI	Examineurs
M. VILKAS	

Ce travail a été intégralement effectué depuis Janvier 1972 dans les laboratoires du Services des Molécules Marquées du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

Je tiens à exprimer la profonde reconnaissance et à remercier Monsieur le Docteur L. PICHAT qui, après m'avoir accueilli dans ses laboratoires et proposé ce sujet, m'a toujours prodigué les meilleurs conseils.

Monsieur le Professeur S. DAVID, Président du jury de la thèse, a suivi de très près le déroulement de mes travaux ; je l'en remercie très sincèrement.

Je voudrais vivement remercier Messieurs les Professeurs H. KAGAN, J. POLONOVSKI et M. VILKAS d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Durant ces cinq années, dans la réalisation de mon travail, mais aussi sur le plan humain, chaque personne du Service m'a beaucoup apporté ; je voudrais souligner leur aide et les en remercier.

Enfin, je n'oublie pas mes camarades de thèse, Messieurs les Docteurs J.P. BEAUCOURT, J.P. GUILBERT et M. PARQUET, avec qui nous avons, au cours de discussions fréquentes, tenté de résoudre les différents problèmes posés par nos sujets respectifs.

RESUME

Depuis ces dernières années, les recherches se sont beaucoup développées dans le domaine des lipides qui sont, au même titre que les glucides et les protides, des constituants essentiels de la matière vivante.

L'importance biologique de cette vaste classe de composés est certaine. Les lipides peuvent être aussi bien des éléments de structure (membranes, tissus physiologiquement essentiels ; tissus nerveux et hépatiques...) que des sources d'énergie ; ils participent aussi au transport de cations à travers les parois cellulaires, au mécanisme de sécrétions de certaines glandes ...

- BUT DU TRAVAIL

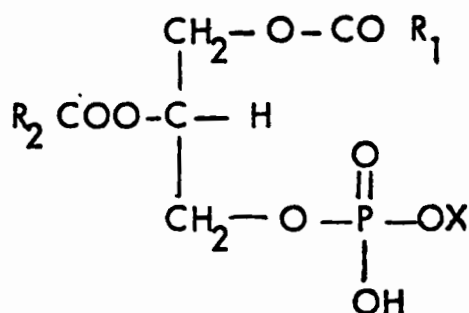
Pour mieux comprendre leur rôle, et notamment celui des glycérides et des glycéro-phospholipides, de nombreuses équipes souhaitaient disposer de certains de ces composés marqués au carbone 14. Ces molécules devaient satisfaire à plusieurs critères :

- une composition chimique bien définie
- une activité spécifique assez élevée
- des positions de marquage préalablement précisées
- une configuration absolue identique à celle des composés naturels.

La synthèse de ces molécules marquées constitue le but de notre travail.

Certains de ces critères sont impossibles à satisfaire par voie biologique ; nous nous sommes donc proposés de mettre au point par voie chimique des méthodes de synthèse totale, originales ou non, compatibles avec les exigences inhérentes à la préparation de molécules marquées.

Alors que les glycérides sont formés d'un squelette glycérol mono, di ou triestérifié par des acides gras, la structure des phospholipides est généralement :



où R_1 et R_2 sont des chaînes aliphatiques d'acides gras.

X = éthanolamine	phosphatidyl-éthanolamine (P.E.)
X = choline	phosphatidyl-choline (P.C.)
X = sérine	phosphatidyl-sérine (P.S.)
X = glycérol	phosphatidyl-glycérol (P.G.)

- EXPOSE DES METHODES. RESULTATS OBTENUS

Nous avons utilisé comme produit de départ commun à toutes les synthèses de glycérides et de glycérophospholipides réalisées dans ce travail, l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol (isopropylidène D-glycérol) que nous avons préparé à partir de D-mannitol.

Nous avons, dans le but d'optimiser les rendements de l'étape d'acylation, effectué une étude de l'estérification par les acides gras des hydroxyles primaires ou secondaires des dérivés du glycérol. Nous avons utilisé différentes méthodes d'activation des fonctions acides :

- à l'aide de carbonyl-diimidazole,
- à l'aide du chlorure de l'acide triisopropyl-benzène-sulfonique (T.P.S.),
- par formation du chlorure d'acide.

Pour des raisons pratiques, la méthode d'acylation par les chlorures d'acides gras marqués a été retenue dans toute la suite de notre travail.

- Dans le domaine des glycérides

A partir de benzyl-3 sn-glycérol ont été obtenus en deux étapes : le palmitoyl-1 sn-glycérol et le dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol marqués avec des rendements actifs par rapport à l'acide voisins de 70 %.

De même, l'estérification de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol conduit, après déprotection, au dérivé palmitoyl-3 sn-glycérol avec un rendement de 43 % par rapport à l'acide.

La synthèse d'un diglycéride mixte, le [palmitoyl (^{14}C)-16]-1 [lauryl (^{14}C)-1]-2 sn-glycérol a été réalisée par estérification "pas à pas" du benzyl-3 sn-glycérol suivie d'une hydrogénolyse du groupe benzyle.

- Dans le domaine des glycérophospholipides

Les schémas sont beaucoup plus complexes et font intervenir plusieurs étapes actives.

Les phospholipides marqués ont été préparés dans une première partie du travail par adaptation des méthodes classiques à la synthèse de produits radioactifs ; dans un deuxième temps, nous avons mis au point un type de synthèse original pour y parvenir.

1 - Synthèses classiques adaptées à la préparation de phospholipides marqués (^{14}C)

L'utilisation des méthodes d'acylation de dérivés glycérophosphoryl-choline ou éthanolamine (Schémas 16, 17, 18) ne doit pas être préconisée car les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants par rapport à ceux fournis par les méthodes suivantes.

Les méthodes que nous avons retenues consistent, dans un premier stade, à effectuer la condensation du sel d'argent d'un diester phosphorique sur le diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol (le dérivé bromé présente de nombreux avantages sur le dérivé iodé).

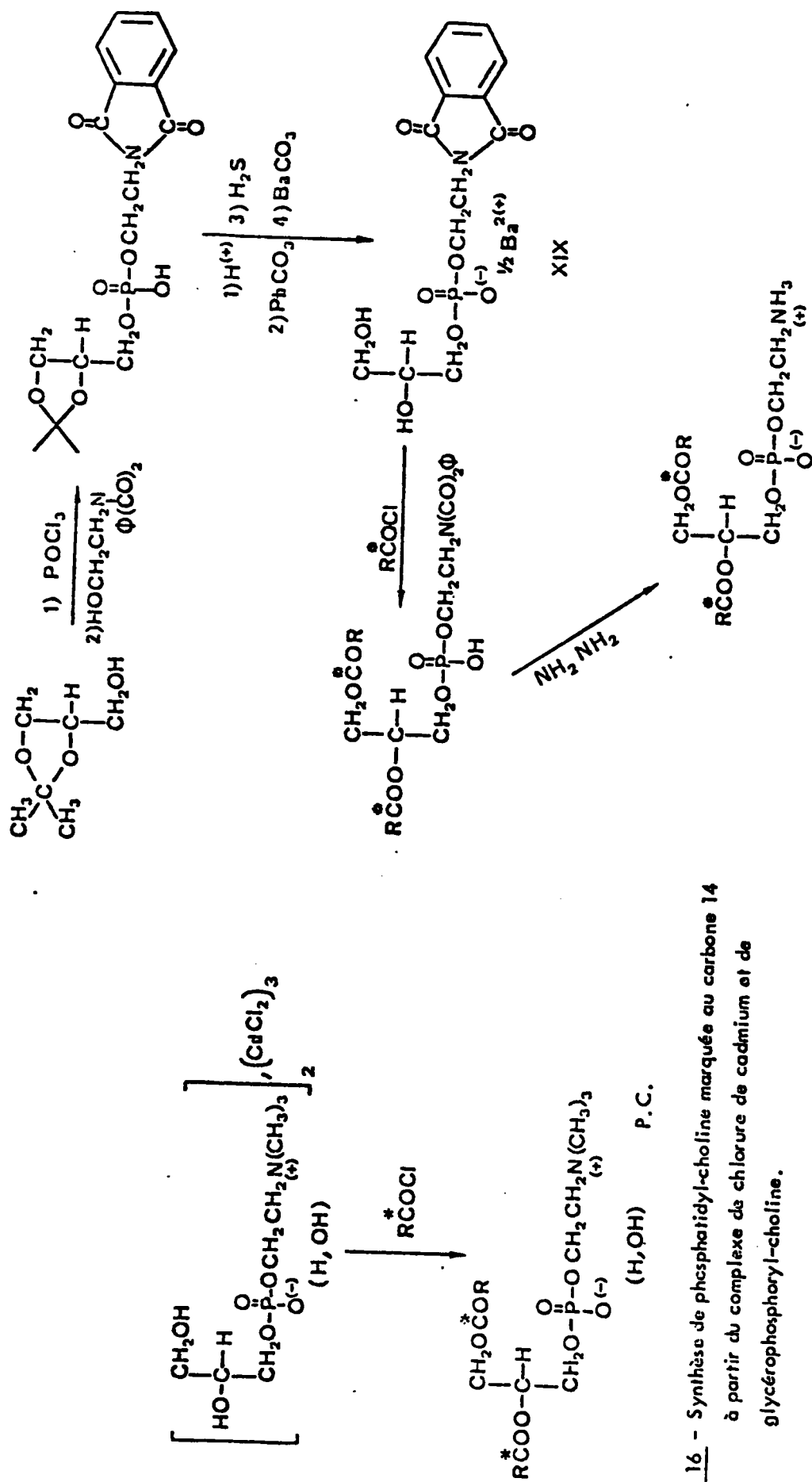


Schéma 16 - Synthèse de phosphatidyl-choline marquée au carbone 14 à partir du complexe de chlorure de cadmium et de glycérophosphoryl-choline.

Schéma 17 - Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 à partir de glycérophosphoryl-éthanolamine N-phthaloylée.

P. E.

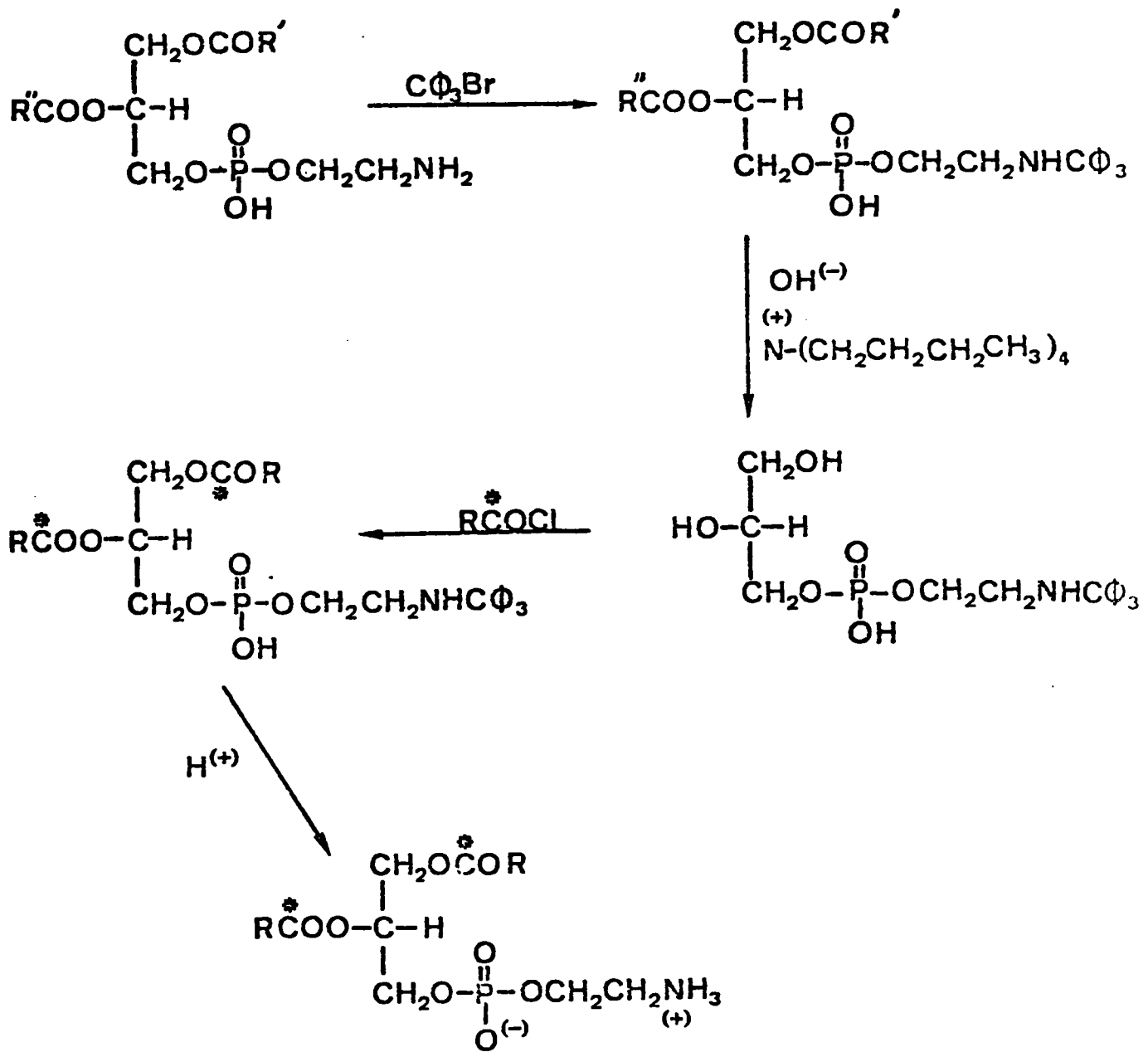


Schéma 18 - Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 par acylation de glycérophosphoryl-éthanolamine N-tritylée.

Les autres étapes varient suivant la nature du substituant X et celle des acides gras (saturés ou non).

Les derniers stades consistent en la déprotection des différentes fonctions bloquées (acide, alcool, amine) par les méthodes appropriées à chaque cas (hydrogénation, hydrolyse acide ou basique, ...).

Les schémas 7, 9 et 15 résument les différents chemins réactionnels empruntés.

Ces méthodes nous ont permis de préparer les différentes classes de phospholipides marqués (P.E. , P.C. , P.S. , L.P.E.). Dans ces composés les acides gras peuvent être identiques ou non, saturés ou non (P.E.).

L'activité spécifique des phospholipides marqués préparés varie de 0,5 mCi/mMole à 20 mCi/mMole.

Les rendements actifs obtenus par rapport à l'acide gras de départ varient de 10 % pour la P.S. à 30 % pour la P.C. ; quant à la P.E. les rendements sont de 20 % (schéma 7) et de 30 % (schémas 9 et 15). La synthèse active suivant le schéma 15 est possible pour les P.E. dans lesquelles les acides gras sont saturés, tandis que le schéma 9 sera suivi pour la synthèse de dérivés insaturés.

La grande pureté chimique des produits obtenus, ainsi que leur structure ont été confirmées à l'aide des différentes méthodes classiques : chromatographiques, enzymatiques (phospholipase A_2 preuve de la bonne configuration des composés synthétisés), ainsi que par l'utilisation des méthodes de résonance magnétique nucléaire et de spectrométrie de masse ; parallèlement à ces renseignements, la radioactivité de ces composés avec les techniques qui lui sont propres (radiochromatographie, autoradiographie et contrôle de l'activité spécifique) permet de donner un autre critère de pureté très sérieux aux produits préparés.

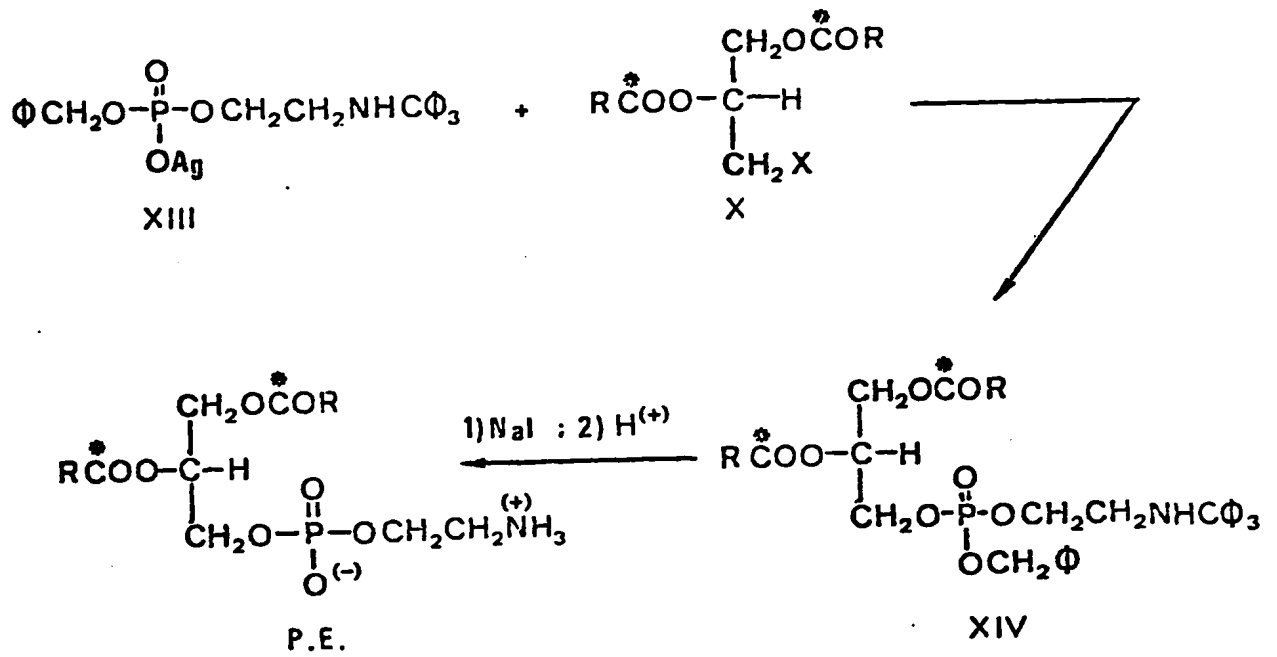


Schéma 9 - Préparation de phosphatidyl éthanolamine marquée au carbone 14.

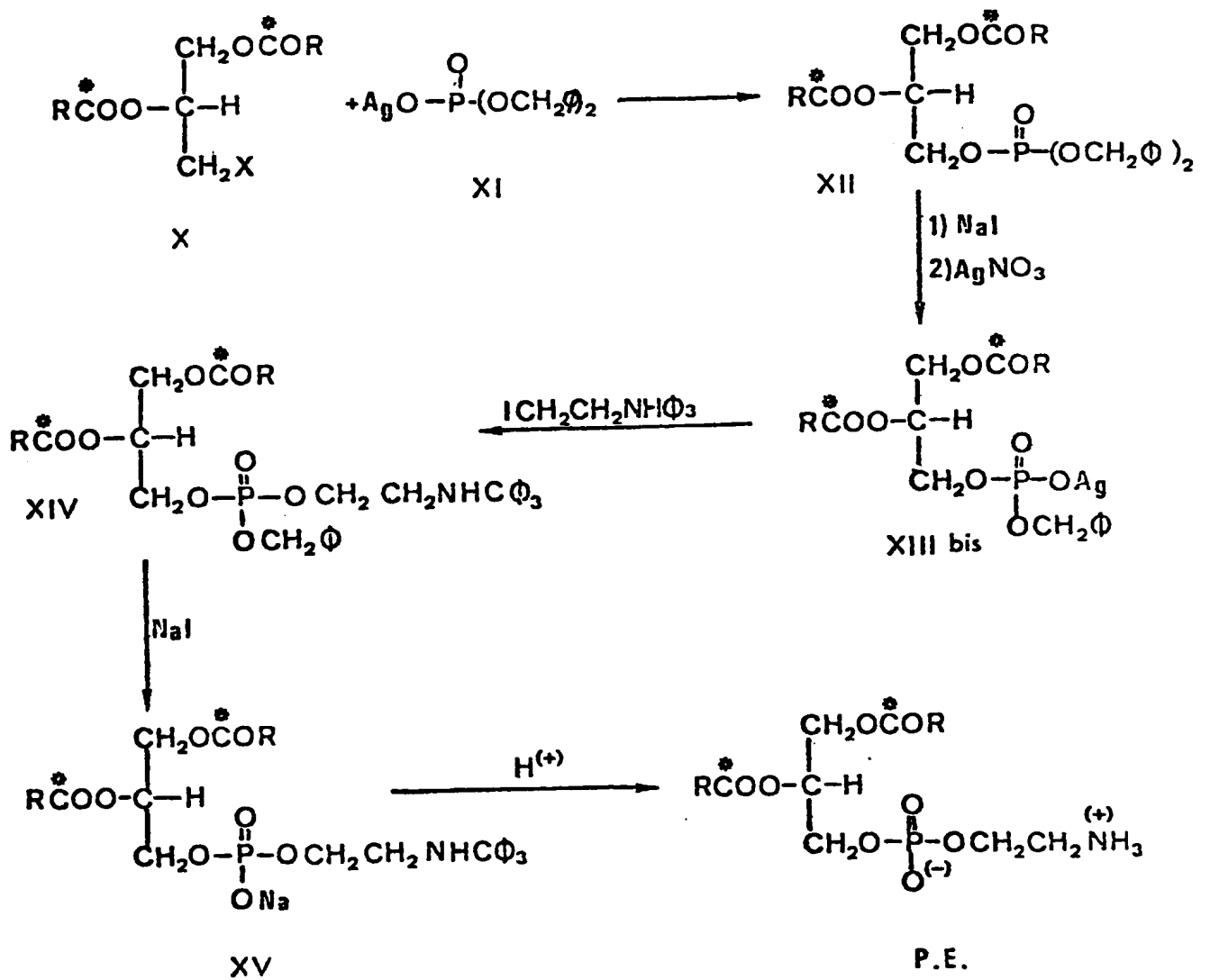
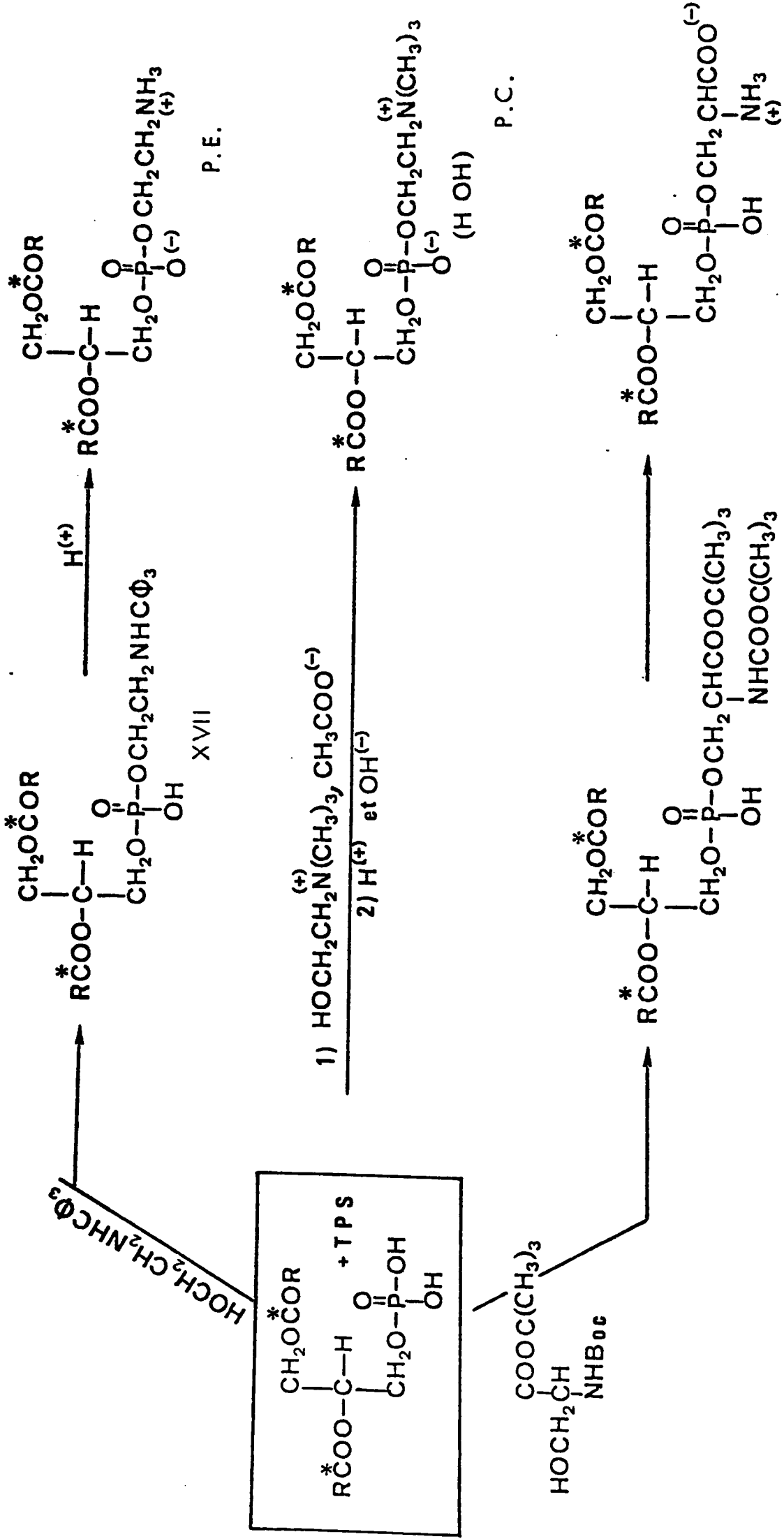


Schéma 7 - Préparation de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14.



2 - Voie d'accès originale à la synthèse de phospholipides

Ce mode de synthèse fait appel au "pyrophosphate d'énediol cyclique" (bis(butène-2 diyl-2,3) pyrophosphate) très récemment introduit par R. RAMIREZ dans le domaine de la chimie des phosphodiesteres asymétriques.

Le schéma de principe en est simple : schémas 22 et 23.

Le diacyl-1,2 sn-glycérol réagirait sur le pyrophosphate pour donner le phosphotriester cyclique (XXI) lui-même réagissant, sans avoir été isolé sur la fonction primaire d'un alcool (éthanolamine, glycérol, sérine, sucre, ...) convenablement protégé. La déprotection de l'alcool et l'hydrolyse du groupe acétoinyle seraient ensuite effectuées.

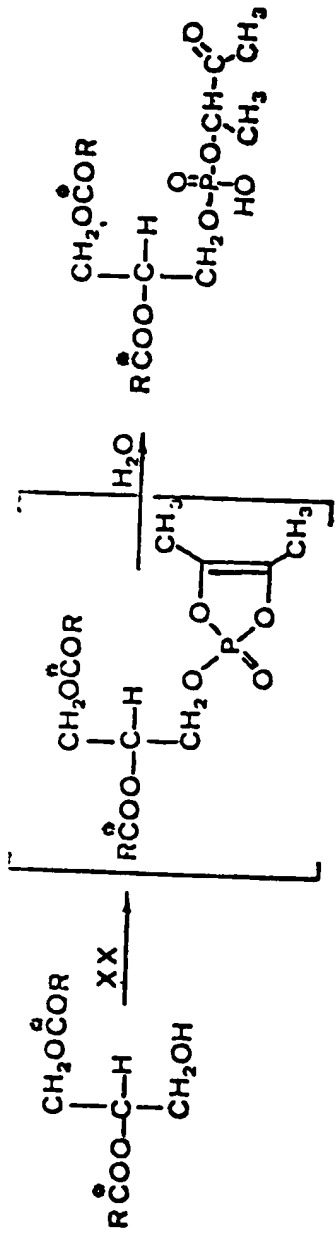
Après avoir montré que dans les conditions de la réaction, notamment lors de l'hydrolyse basique du groupe acétoinyle, les liaisons esters carboxyliques sont stables, nous avons prouvé que cette méthode est effectivement applicable à la synthèse de phospholipides de configuration absolue naturelle en réalisant celle de phosphadityl-éthanolamine et phosphatidyl-glycérol (P.E. et P.G.).

Sur le plan pratique, les conditions opératoires sont très simples ; le temps nécessaire est relativement court ; le rendement est d'environ 13 % par rapport à l'acide gras.

Cette méthode est applicable à de très faibles quantités (0,02 mMole).

Il est sûr que cette méthode originale aura un développement important dans le domaine de la synthèse de phospholipides complexes.

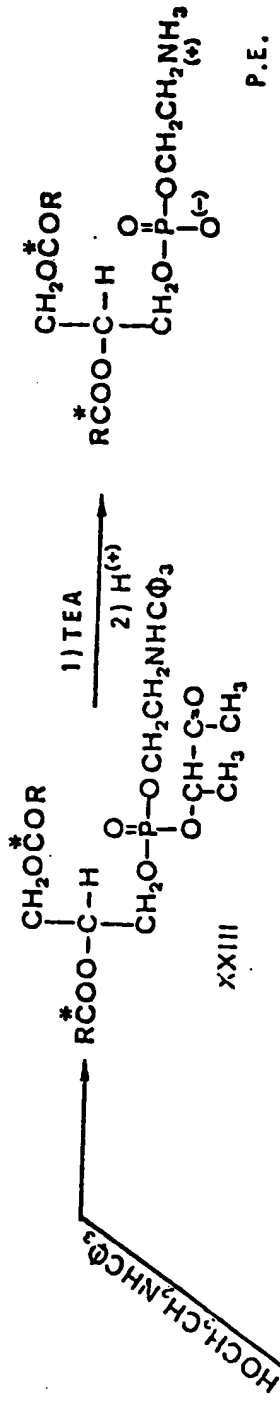
Parallèlement à nos travaux viennent d'ailleurs d'être publiées (Juillet et Novembre 1976) les synthèses de phospholipides et analogues, réalisées par l'équipe de F. RAMIREZ en suivant un protocole similaire ; ces publications confirment l'intérêt certain de la méthode.



XXI

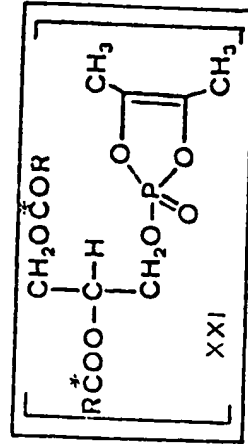
XXII

Schéma 22 - Condensation du dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol sur le pyrophosphate XX.

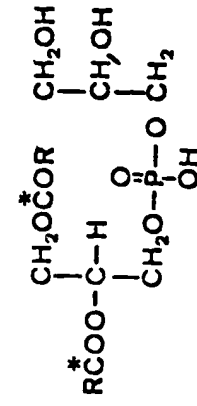


XXIII

P.E.

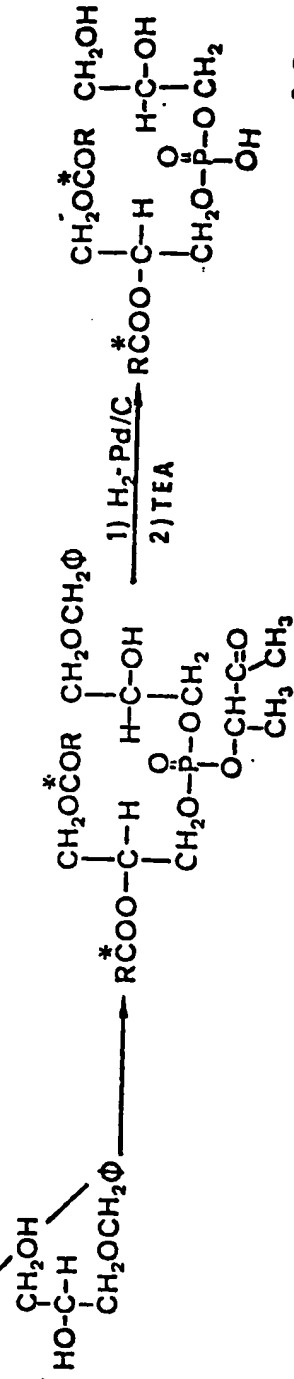


XXI



XXIV

analogue de P.G.



XXV

P.G.

Schéma 23 - Synthèse de phospholipides à l'aide du pyrophosphate "d'énédiol cvclim.23"

PLAN DE LA THESE

	<u>Page</u>
- INTRODUCTION	
<u>A - Les molécules marquées : leurs propriétés, leurs particularités</u>	
I - Les molécules marquées au carbone 14 et au tritium	1
II - Particularités de la synthèse des molécules marquées	2
III - Mesure de la radioactivité	4
1 - Définition de l'unité de mesure	4
2 - Méthodes de mesure	4
a) Mesure au Bremsstrahlung	
b) Mesure par scintillation liquide	
3 - Notion d'activité spécifique	6
IV - Purification et contrôle de la pureté des molécules marquées	7
1 - Purification	7
2 - Contrôles de pureté	7
3 - Stockage et autoradiolyse	9
V - Application des molécules marquées	10
<u>B - Les lipides : structure et intérêt biologique</u>	
1 - Définition et structure des lipides	11
2 - Biosynthèse et dégradation des glycérides et phosphatides	15

a) Glycérides	
b) Phosphatides	
3 - Répartition des lipides ; leur rôle biologique	17
a) Les glycérides	
b) Les phospholipides et glucolipides	

C - Notre objectif

1 - But du travail	19
2 - Remarques concernant le travail expérimental	19

- PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I - SYNTHESSES DE GLYCERIDES

Règles de nomenclature	22
------------------------------	----

A - Schémas de synthèse

1 - Synthèse de l'acétone D-glycérol	24
2 - Synthèse du [palmitoyl (^{14}C)-16]-1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)	25
3 - Diglycérides mixtes : Synthèse du [palmitoyl (^{14}C)-16]-1 [lauryl (^{14}C)-1]-2 sn-glycérol (1,1 mCi/mMole)	26
4 - Synthèse du [palmitoyl (^{14}C)-1]-3 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)	27

B - Modes opératoires

1 - Acétone D-glycérol	29
2 - [(palmitoyl (^{14}C)-16)-1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)	29
a) Isopropylidène-1,2 benzyl-3 sn-glycérol	30
b) Passage au benzyl-3 sn-glycérol	31

c) Estérification du benzyl-3 sn-glycérol	31
d) [palmitoyl (^{14}C)-16]-1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)	32
e) Caractérisation du dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol	33
3 - Diglycérides mixtes [palmitoyl (^{14}C)-16]-1 [lauryl (^{14}C)-1]-2 sn-glycérol (1,1 mCi/mMole)	34
4 - [palmitoyl (^{14}C)-1]-3 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole).....	35
a) Isopropylidène palmitoyl-3 sn-glycérol	35
b) Hydrolyse du groupe isopropylidène	36

CHAPITRE II - SYNTHÈSES DE PHOSPHOLIPIDES MARQUÉS PAR ADAPTATION DES MÉTHODES CLASSIQUES À LA SYNTHÈSE DE MOLECULES RADIOACTIVES

A - Schémas de principe

1 - Préparation de glycérophospholipides marqués à partir des diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérols	40
1 - Préparation du dérivé halogéné	40
2 - Détermination de la méthode à retenir pour l'estérification de dérivés du glycérol	41
a) Utilisation du chlorure de l'acide trisopropyl-benzène- sulfonique (T.P.S.)	42
b) Utilisation du carbonyl-diimidazole	42
c) Acylation par les chlorures d'acides gras marqués	43
3 - Différentes possibilités de former la liaison ester-phosphorique ...	44
4 - Synthèses de différentes classes de glycérophospholipides à partir d'acide phosphatidique	51
a) Choix de la méthode de phosphorylation	53
b) Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine, choline et sérine marquées	55

II - Synthèses de phosphatidyl-éthanolamine (P.E.) et phosphatidyl- choline (P.C.) marqués à partir de dérivés glycérophosphoryl- éthanolamine et choline	57
1 - A partir de glycérophosphoryl-choline	57
2 - A partir de glycérophosphoryl-éthanolamine N-phtaloylée ou N-tritylée	57
III - Conclusions	62
B - <u>Modes opératoires</u>	
I - Préparation de glycérophosphatides à partir du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol	63
A) Synthèses des dérivés diacyl-1,2 bromo (ou iodo) sn-glycérol	63
1 - Halogéno-3 sn-glycérols	63
2 - Différentes méthodes d'estérification	64
a) A l'aide du chlorure de l'acide triisopropyl-benzène- sulfonique	64
b) A l'aide de carbonyl-diimidazole	64
c) Estérification par le chlorure d'acide	65
. Préparation du chlorure d'acide	
. Estérification	
3 - Purification du diacyl-halogéno sn-glycérol marqué	66
B) Synthèses de P.E. (2 mCi/mMole) par condensation de iodo-trityléthylamine sur le sel d'argent de l'ester benzylique de l'acide dipalmitoyl-phosphatidique	
1 - Diester benzylique de l'acide phosphatidique	68
2 - O-benzyl N-trityl dipalmitoyl P.E. (2 mCi/mMole)	71
a) Sel d'argent de l'ester benzylique de l'acide phosphatidique ..	71
b) Condensation du sel d'argent sur la iodotrityléthylamine	72

c) Dipalmitoyl P.E. (2 mCi/mMole)	73
. Débenzylation	
. Détritylation	
 C) Préparation de phosphatidyl-éthanolamine insaturée, de dérivés mixtes et de dérivés lyso par condensation du sel d'argent du diester benzylique et N-trityléthylique de l'acide phosphatidique sur le diacyl-1,2 halogène-3 sn-glycérol	
1 - Détermination des conditions de condensation du sel d'argent sur les dérivés halogénés	75
2 - Dioléyl-1,2 sn-P.E. (1 mCi/mMole)	75
a) Dioléyl-1,2 bromo-3 sn-glycérol (1 mCi/mMole)	76
b) Condensation avec le sel d'argent	77
c) Obtention de la dioléyl P.E. (1 mCi/mMole)	78
. Débenzylation	
. Détritylation	
3 - Préparation de dérivés mixtes	80
a) Palmitoyl-1 bromo-3 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)	80
b) Palmitoyl-1 oléyl-2 bromo-3 sn-glycérol (0,8 mCi/mMole) ..	81
4 - Synthèse chimique de lyso D,L-palmitoyl P.E. (1 mCi/mMole) ...	82
a) D,L-tritylbromoglycérol 	83
b) Estérification	83
c) Condensation avec le sel d'argent	84
d) Déprotection	85
 D) Synthèses des différentes classes de phospholipides marqués à partir de l'acide phosphatidique	
1 - Acide dipalmitoyl-phosphatidique (1 mCi/mMole)	86
2 - Dipalmitoyl P.E. (1 mCi/mMole)	87

a) Condensation avec la N-trityléthanolamine	87
b) Déprotection	87
3 - Dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (20 mCi/mMole)	88
4 - Dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (1 mCi/mMole)	89
a) Acétate de choline	89
b) Condensation sur l'acide phosphatidique	89
5 - Dipalmitoyl-Phosphatidyl-sérine (1 mCi/mMole)	90
- <u>DEUXIEME PARTIE</u> - VOIE ORIGINALE D'ACCES A LA SYNTHÈSE DE PHOSPHOLIPIDES - UTILISATION DU "PYRO- PHOSPHATE D'ENEDIOL CYCLIQUE"	
A - <u>Schéma de principe</u>	92
I - Généralités	92
1 - Synthèse du pyrophosphate	93
2 - Son utilisation pour la synthèse de phosphodiester mixtes	94
II - Application à la synthèse de phospholipides	96
1 - Exposé du schéma de principe	96
2 - Résultats obtenus ; validité de la méthode	97
a) Synthèse de sn-phosphatidyl-éthanolamine	98
b) Synthèse de sn-phosphatidyl-glycérol de configuration naturelle	98
c) Synthèse de sn-phosphatidyl D, L-glycérol, analogue de P.G. naturel	99
d) Synthèse de sn-phosphatidyl-glucose	100
e) Justification du choix de la méthode d'hydrolyse du groupe acétoïne	100
III - Conclusions	101

B - Protocole expérimental

1 - Pyrophosphate XX	102
2 - Conditions générales de la réaction	102
3 - Sn-phosphatidyl-éthanolamine	105
a) Sn-phosphatidyl-éthanolamine acétoïnylée et N-tritylée	105
b) Hydrolyse des groupes protecteurs	106
4 - Sn-phosphatidyl D, L-glycérol	107
a) Sn-phosphatidyl D, L-glycérol acétoïnylé	107
b) Déprotection	108
5 - Sn-phosphatidyl-1 sn-glycérol (P.G.)	108
a) Sn-phosphatidyl-glycérol acétoïnylé et benzylé	108
b) Déprotection	109
- CONCLUSION GENERALE	111
- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112

	Pages
<u>Schéma 1</u> - Synthèse de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol.	24
<u>Schéma 2</u> - Préparation du palmitoyl-1 sn-glycérol.	25
<u>Schéma 3</u> - Préparation du palmitoyl-1 lauryl-2 sn-glycérol.	27
<u>Schéma 4</u> - Préparation de monopalmitoyl-3 sn-glycérol.	28
<u>Schéma 5</u> - Préparation du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol.	40
<u>Schéma 6</u> - Préparation du sel d'argent de l'ester dibenzyle de l'acide phosphorique	45
<u>Schéma 7</u> - Préparation de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14. ...	45
<u>Schéma 8</u> - Préparation du sel d'argent du diester benzyle et N-trityléthylamino de l'acide phosphorique.	47
<u>Schéma 9</u> - Préparation de phosphatidyl éthanolamine marquée au carbone 14.	47
<u>Schéma 10</u> - Préparation de dérivés mixtes : palmitoyl-1 oléyl-2 phosphatidyl-éthanolamine	48
<u>Schéma 11</u> - Synthèse de lyso-D,L-phosphatidyl éthanolamine marquée au carbone 14.	50
<u>Schéma 12</u> - Synthèse du sel d'argent du diester tertiobutylique de l'acide phosphorique.	52
<u>Schéma 13</u> - Préparation d'acide phosphatidique marqué au carbone 14.	52
<u>Schéma 14</u> - Synthèse de l'ester tertiobutylique de la N-terbutyloxycarbonyl L-sérine.	55
<u>Schéma 15</u> - Préparation à partir d'acide phosphatidique de phosphatidyl-éthanolamine, choline et série marquées au carbone 14.	56
<u>Schéma 16</u> - Synthèse de phosphatidyl choline marquée au carbone 14 à partir du complexe de chlorure de cadmium et de glycérophosphoryl-choline. ..	58
<u>Schéma 17</u> - Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 à partir de glycérophosphoryl-éthanolamine N-phthaloylée.	59

<u>Schéma 18</u>	- Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 par acylation de glycérophosphoryl-éthanolamine N-tritylée.	60
<u>Schéma 19</u>	- Synthèse d'un phosphodiester mixte à partir du "pyrophosphate d'énédiol cyclique".	94
<u>Schéma 20</u>	- Hydrolyse de l'acétoinyl-diméthyl-phosphate.	95
<u>Schéma 21</u>	- Synthèse de pyrophosphate "d'énédiol cyclique"	96
<u>Schéma 22</u>	- Condensation du dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol sur le pyrophosphate XX.	96
<u>Schéma 23</u>	- Synthèse de phospholipides à l'aide du pyrophosphate "d'énédiol cyclique"	97

ABREVIATIONS UTILISEES

A.S.	: activité spécifique
C.C.M.	: chromatographie sur couche mince
C.P.V.	: chromatographie en phase vapeur
D.C.C.	: dicyclohexyl-carbodiimide
D.M.F.	: diméthyl formamide
mCi	: millicurie
mMole	: millimole
L.P.L.	: lyso-phospholipide
P.C.	: phosphatidyl-choline
P.E.	: phosphatidyl-éthanolamine
P.G.	: phosphatidyl-glycérol
P.L.	: phospholipide
P.S.	: phosphatidyl-sérine
R.M.N.	: résonance magnétique nucléaire (proton H)
R.M.C.	: résonance magnétique du carbone ¹³ C
S.M.	: spectrométrie de masse
T.C.A.	: trichlor-acétonitrile
T.E.A.	: triéthylamine
T.H.F.	: tétrahydrofurane
T.P.S.	: chlorure de l'acide triisopropyl benzène-sulfonique
U.V.	: ultra-violet

INTRODUCTION

A - Les molécules marquées, leurs propriétés, leurs particularités

Les molécules marquées sont des molécules dans lesquelles un ou plusieurs atomes sont remplacés par un de leurs isotopes (stables ou radioactifs).

Ces isotopes stables, (^2D , ^{15}N , ^{13}C , ^{18}O) ou radioactifs (^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{11}C), permettent au sein d'un milieu de localiser et suivre ces molécules, ainsi que leurs dérivés formés in situ, par des méthodes appropriées à chaque isotope (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse, radioactivité).

I - Les molécules marquées au carbone 14 et au tritium

Au Service des Molécules Marquées du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay / 125 / nous travaillons avec la plupart des isotopes stables mais dans le domaine radioactif nous nous sommes spécialisés dans le marquage de molécules organiques par le tritium et le carbone 14.

Ces deux isotopes sont produits par irradiation neutronique de cibles contenant du nitrure d'aluminium ou de béryllium dans le cas du carbone 14 et du lithium dans le cas du tritium.



Ces deux atomes sont des émetteurs de particules β dont l'énergie est de 0,018 MeV pour le tritium et de 0,159 MeV pour le carbone 14.

Avec une période de décroissance radioactive de 5 730 ans, le carbone 14 se transforme en azote 14 tandis que le tritium produit de l'hélium 3 avec une période de 12,26 ans.

Les activités théoriques maximales sont de 29,2 Ci/atome de tritium et de 62,4 mCi/atome de carbone 14. Cette différence orientera le choix du radio-isotope suivant l'utilisation prévue.

II - Particularités de la synthèse des molécules marquées

Cette synthèse peut s'effectuer de deux façons :

- la voie biologique permet d'obtenir des molécules avec une haute activité spécifique mais avec une position de marquage, fonction de leur biosynthèse ; elles sont alors uniformément marquées ou marquées en certaines positions connues ou non ;
- la synthèse totale par voie chimique permet d'obtenir des positions de marquage parfaitement bien définies surtout dans le cas du carbone 14.

Ces synthèses se heurtent à de nombreux problèmes qui leur sont spécifiques :

. Nature de la matière première (T_2O , T_2 , $Ba^{14}CO_3$) à partir de laquelle doivent être élaborés des précurseurs adaptés à la classe de molécule choisie (Cf. Tableau 1).

. En raison du prix de revient, il est obligatoire de rechercher la méthode de synthèse présentant le moins de difficultés, le moins d'étapes actives, mais aussi les meilleurs rendements entre les différentes étapes.

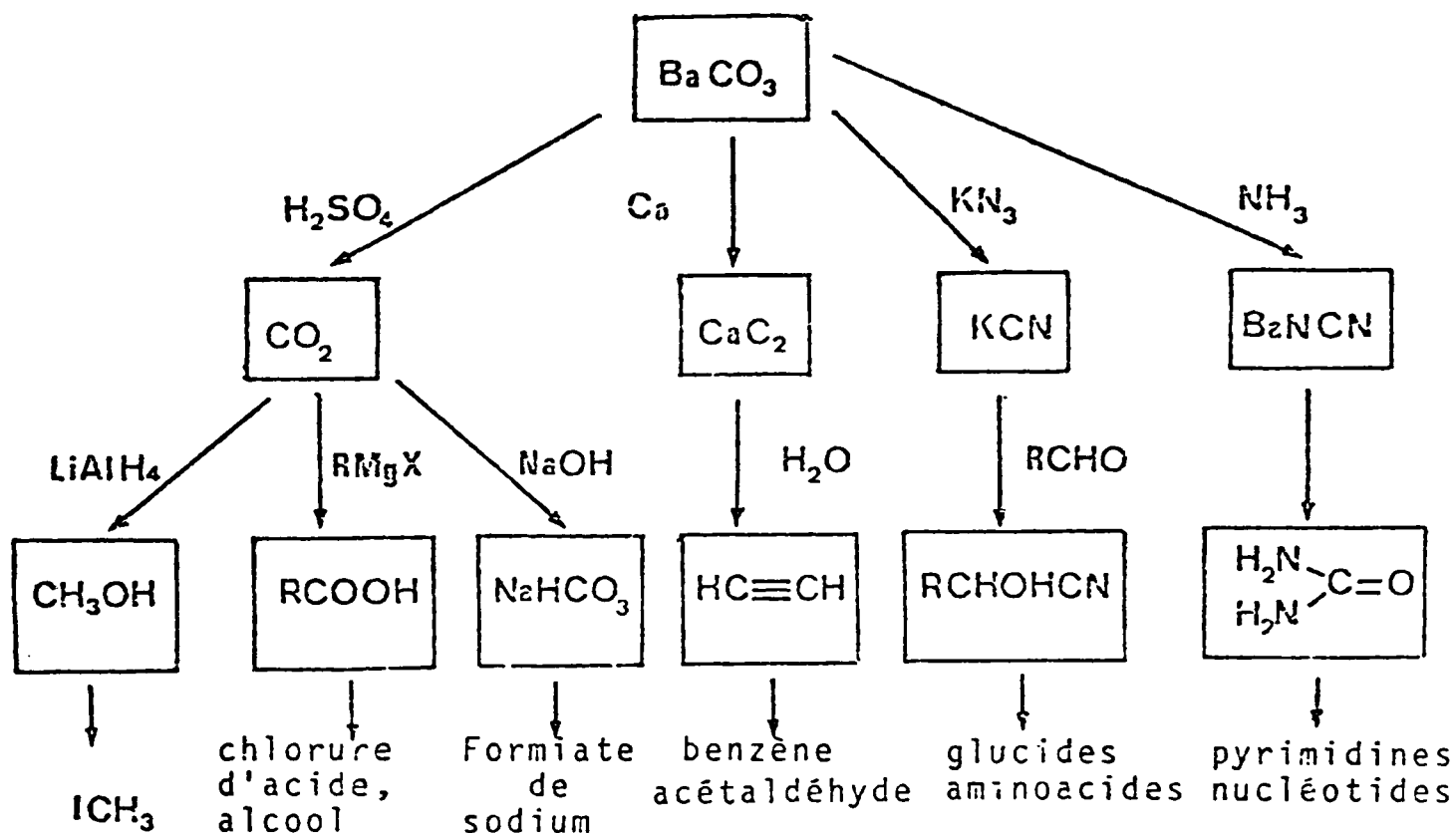


Tableau 1 : Elaboration, à partir de $Ba^{*}CO_3$, des différents précurseurs

Les synthèses se font en général par adaptation et miniaturisation de méthodes classiques à la synthèse radioactive. Du fait des micro-quantités mises en jeu (très souvent inférieures à la millimole) il est quelquefois très difficile d'obtenir les mêmes résultats que lorsque les schémas prévus sont appliqués à des quantités pondérales.

Les interactions avec les solvants, les impuretés qu'ils contiennent (eau, peroxydes, ...), les effets de dilution, ne sont pas à négliger.

Ceci implique d'utiliser les réactifs (actifs ou non) et les solvants présentant les meilleurs critères de pureté. De plus, des essais "à blanc" puis en "traceurs" dans les conditions exactes de la réaction active prévue, doivent être systématiquement effectués avant tout essai "actif".

III - Mesure de la radioactivité

1 - Définition de l'unité de mesure de radioactivité

Quel que soit le radioélément considéré, l'unité de mesure : la Curie (Ci) (ou millicurie (mCi)) est rattachée à un nombre de désintégrations par unité de temps.

Ainsi une millicurie correspond à $3,7 \cdot 10^7$ désintégrations par seconde.

2 - Méthodes de mesure

Suivant les activités mises en jeu, dans le cas du carbone 14, les activités d'une solution peuvent être mesurées :

- par Bremsstrahlung (rayonnement de freinage),
- par scintillation liquide.

a) Les fortes activités peuvent être quantifiées par mesure au Bremsstrahlung

Tout électron au contact de la matière émet un rayonnement dit de freinage ou de Bremsstrahlung de nature électromagnétique (X ou γ).

Cette propriété est mise à profit dans cette méthode de mesure. En effet, si dans un tube de verre on introduit une substance radioactive émettrice de β , les électrons au contact du verre donneront des rayons X et γ qui peuvent aller exciter un cristal de iodure de sodium activé par du thallium. Cette excitation a pour résultat l'émission de photons que l'on peut compter grâce à un photomultiplicateur qui transforme l'énergie lumineuse en impulsions électriques.

Après étalonnage de l'appareil grâce à des solutions témoins, il est possible de mesurer l'activité d'une substance dissoute dans un solvant (des coefficients

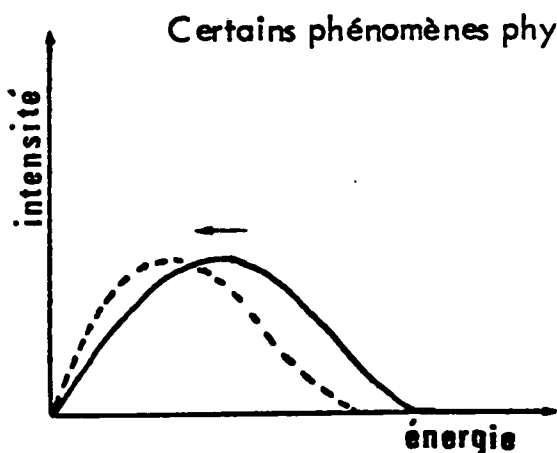
sont attribués à chaque solvant). Nous mesurons ainsi, avec une précision de 5 % en carbone 14, des solutions dont l'activité varie de 15 μ Ci à 1 mCi/ml. Les principaux avantages de cette méthode sont de permettre un comptage sans dilution de solutions concentrées, ni destruction du produit actif que l'on récupère, en totalité, après mesure.

b) Dans le cas de solutions d'activité plus faibles, notamment dans les travaux biologiques ou biochimiques, la méthode de comptage par scintillation liquide est la méthode de choix.

Les photons produits par l'excitation de produits scintillants mis en présence de substances radioactives sont comptés par un photomultiplicateur.

Le mélange fluorescent généralement retenu est un mélange de P.O.P.O.P. (Bis-(phényl-5 oxazolyl-2) 1,4 benzène) et de P.P.O. (diphényl-2,5 oxazole) en solution dans le toluène.

Tandis que le P.P.O. sert à convertir l'énergie des particules β en énergie lumineuse, le P.O.P.O.P. est utilisé pour déplacer la longueur d'onde de la lumière émise vers un domaine du spectre où le photomultiplicateur est plus sensible.



courbe représentant le nombre de photons émis en fonction de l'énergie vers les basses énergies. C'est l'affaiblissement (ou "quenching") qui diminue le rendement du comptage, et dont on doit tenir compte pour évaluer le rendement du compteur.

Ainsi, tenant compte de la nature de l'émetteur et du rendement du compteur, le nombre de coups par minute est converti en nombre de désintégrations par minute, donc en activité.

Cette méthode permet le dosage simultané du carbone 14 et du tritium, forme de comptage très utilisée en biologie.

Les gammes de comptage pour le carbone 14 s'étendent de $10^{-3} \mu\text{Ci}$ à $10^{-1} \mu\text{Ci}$, tandis qu'une activité de $10^{-2} \mu\text{Ci}$ de tritium peut être comptée.

Les avantages de cette méthode sont la rapidité, l'étendue de la gamme de comptage et l'utilisation d'une quantité minime de produit.

3 - Notion d'activité spécifique

Cette notion est extrêmement importante dans le domaine des molécules marquées ; c'est en fonction de cette donnée que l'utilisateur oriente, pour un travail précis, le choix du marqueur à introduire ou son protocole expérimental (notamment la dilution).

L'activité spécifique d'une molécule (A.S.) est définie comme l'activité rapportée à une molécule/gramme. Elle s'exprime en général en millicuries/millimole (mCi/mMole) ou en Curies/millimole (Ci/mMole).

Sa détermination demande, d'une part, un comptage de la radioactivité de la solution et, d'autre part, un dosage de cette solution (par absorption U.V., par pesée du résidu sec, par colorimétrie, ...).

La spectrométrie de masse, avec ses méthodes de calcul du pourcentage isotopique, permet très facilement de déterminer les activités spécifiques supérieures à 20 mCi/mMole pour le carbone 14 et à 8 Curies/mMole en tritium.

IV - Purification et contrôle de la pureté des molécules marquées

1 - Purification des molécules marquées

La radioactivité des substances à purifier rend certes cette partie du travail plus aisée grâce à la facilité de localisation des produits marqués, mais nous empêche souvent d'utiliser les méthodes classiques (cristallisation, distillation, ...).

Par contre, toutes les méthodes de chromatographie sur colonne (basse et haute pression) utilisant les différents supports (silice d'adsorption ou de partage, gels d'exclusion, échangeurs d'ions, ...) sont applicables. La radioactivité est décelée en continu, par passage devant un détecteur, de l'éluat qui circule dans un serpentin contenant de la poudre de verre scintillant.

Un détecteur d'absorption U. V. peut être branché en série, ainsi qu'une électrovanne coupant toute circulation de liquide en cas de coupure de courant.

Les chromatographies préparatives sur papier et sur plaque sont de même très souvent utilisées au Service des Molécules Marquées.

Les chromatographies préparatives en phase vapeur sont possibles, bien que généralement moins utilisées que les autres méthodes.

2 - Contrôles de pureté

A la notion classique de pureté chimique se superpose celle de pureté radiochimique.

A l'exclusion de l'analyse élémentaire (destruction d'une trop grande quantité de produit marqué, contamination éventuelle par les gaz émis lors de la combustion, ...) toutes les méthodes classiques sont utilisées pour déterminer la

structure et la pureté chimique des produits synthétisés (chromatographies, R.M.N., C.P.V., U.V., S.M.,).

La pureté radiochimique est déterminée, après avoir séparé du produit marqué considéré les éventuels contaminants radioactifs, par chromatographie (sur couche mince ou sur papier : méthode la plus employée), par C.P.V. ou par une autre méthode adaptée (analyseur automatique d'acides aminés).

La visualisation de la répartition de la radioactivité le long d'un chromatogramme après développement peut être effectuée de deux façons :

a) par autoradiographie

Les produits marqués contenant du carbone 14 ou du tritium ont la propriété d'impressionner une plaque photosensible avec laquelle ils ont été mis en contact pendant un certain temps.

Si l'on a pris soin, sur un même chromatogramme, de déposer sur une même ligne de départ deux taches présentant un rapport de dilution connu (en général 1/100), il sera possible, après développement du radiochromatogramme, autoradiographie et révélation de l'autoradiogramme, d'évaluer, par simple comparaison optique du noircissement, le pourcentage des éventuelles impuretés radioactives.

Si cette méthode permet une estimation, elle demeure cependant imprécise, les noircissements photographiques n'étant proportionnels que dans certaines conditions d'impression.

b) par l'enregistrement de la répartition de la radioactivité le long d'un radiochromatogramme qui peut être fait de deux façons :

- Le radiochromatogramme défile devant un compteur Geiger-Müller, sans fenêtre et à circulation de méthane. Ce compteur est relié à un enregistreur qui retransmet le profil de l'intensité de la radioactivité en fonction du défilement.
- Le radiochromatogramme est placé devant un compteur du même type que le précédent mais dont la surface utilisable représente la longueur du radiochromatogramme. L'ensemble est fixe.

Par des procédés technologiques et électroniques appropriés, l'enregistrement point par point de la radioactivité est fait simultanément sur toute la longueur du chromatogramme.

Après accumulation, la visualisation est effectuée sur un écran d'oscilloscope muni d'un dispositif permettant l'intégration des différentes zones du chromatogramme. Cette méthode de visualisation de la répartition de la radioactivité vient d'être introduite au Service des Molécules Marquées (appareil Chromelec 101, Numelec).

3 - Stockage et autoradiolyse

Au cours du temps, les molécules radioactives se dégradent de deux façons :

- par évolution du radioélément lui-même. Cette dégradation est négligeable dans le cas du carbone 14 et du tritium, mais doit être considérée pour des éléments de période plus courte (^{35}S , ^{32}P , ^{11}C , ...).
- l'inter-irradiation des différentes molécules en solution aboutit à des ruptures de liaisons ou à des modifications de structure. Ce phénomène, dénommé autoradiolyse, ne peut être évité; il ne peut qu'être ralenti par une étude systématique pour chaque classe de molécule, des conditions de stockage (basse température, choix ou absence du solvant, concentration).

V - Application des molécules marquées

Nous ne détaillerons pas les applications qui sont nombreuses et s'étendent à des domaines très variés / 126 /.

Les molécules marquées sont en effet un outil essentiel pour permettre au chercheur d'établir un mécanisme de réaction chimique, de localiser et doser les métabolites d'une substance possédant une activité pharmacologique intéressante ou encore de chiffrer une activité enzymatique.

Dans plusieurs de ces domaines, nous assistons actuellement à l'essor des molécules marquées par des isotopes stables (^2D , ^{13}C , ^{15}N). Cet intérêt grandissant s'explique d'une part, par les facilités de synthèse et d'utilisation de telles molécules, mais aussi par le développement des méthodes physico-chimiques R.M.N. par transformée de Fourier (^1H et ^{13}C) et S.M. (ionisation de champ et désorption, techniques de fragmentographie, ...) que permet de doser et de déterminer la structure de quantités infimes de produits marqués à l'aide de ces isotopes stables.

B - Les lipides : Structure et intérêt biologique

Les lipides sont, au même titre que les protides et les glucides, des constituants essentiels de la cellule vivante.

Les différents lipides, malgré leur hétérogénéité de structure, possèdent cependant plusieurs propriétés communes.

1 - Définition et structure des lipides

Le terme "lipide" regroupe en effet une classe de composés pouvant être :

- caractérisés physiquement par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans le chloroforme et le benzène ; beaucoup sont également solubles dans l'alcool, l'acétone et d'autres solvants organiques. Certains d'entre eux peuvent donner lieu à des pseudo-solutions avec l'eau.
- chimiquement définis comme des dérivés d'acides presque exclusivement aliphatiques et comportant un nombre relativement élevé d'atomes de carbone. On sait que dans la majorité des cas il s'agit d'esters de ces acides.

Au point de vue structure, on distinguera donc deux constituants fondamentaux :

- le ou les acides gras obligatoirement présents,
- les éléments qui s'y combinent, le plus souvent des alcools.

Les acides gras sont des chaînes carbonées, saturées ou non, dont le nombre de carbones peut atteindre une valeur élevée.

Associés aux acides gras, on rencontre essentiellement des alcools répartis en trois groupes :

- un triol : le glycérol,
- des alcools polycycliques à structure cyclopentano-phénanthrénique : les stérols, au premier rang desquels le cholestérol,
- des alcools à haut poids moléculaire en chaîne fréquemment saturée, tels l'alcool cétylique en C₁₆.

Les autres composants liés aux acides gras peuvent être :

- l'acide phosphorique,
- des bases aminées (éthanolamine, choline, acides aminés),
- des glucides.

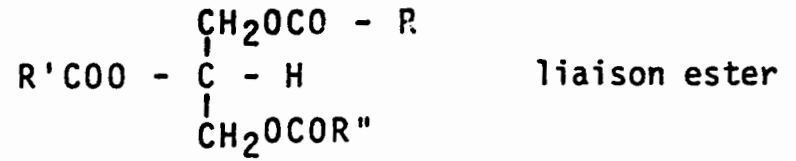
La classification habituelle divise cette classe de composés en lipides simples et lipides complexes.

Sous le nom de lipides simples (Tableau 2) nous classerons uniquement les esters d'acides gras :

- glycérides ou graisses neutres : esters d'acides gras et du glycérol, on distingue suivant le nombre de fonctions estérifiées les mono-, di- ou triglycérides.
- cires : esters d'acides gras et de monoalcool ; ce dernier pouvant être soit un aliphatique (cérides), soit un alcool acyclique (stérides, esters de vitamines A ou D ou d'oxycaroténoïdes).
- les alcényl et les alcoyl-glycérides résultent du remplacement dans les triglycérides d'un acide gras par un aldéhyde gras ou un alcool gras (faible quantité dans divers tissus animaux).

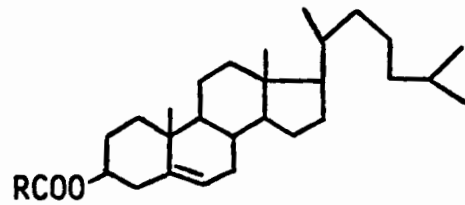
1) Glycérides

Ex : Triglycéride

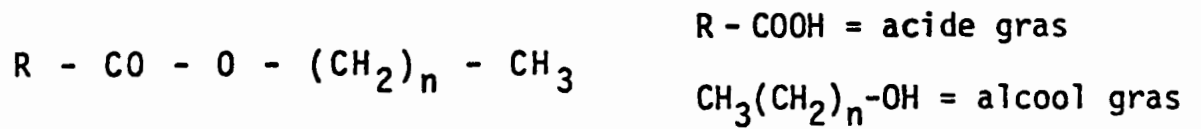


2) Stérides

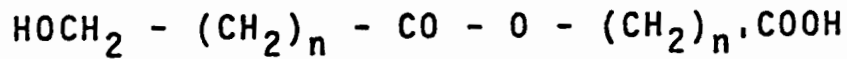
Ex : Ester du cholestérol



3) Cérides



4) Ethiolides



5) Ethéro - glycérides

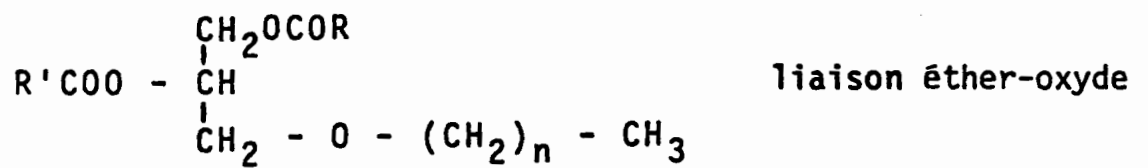
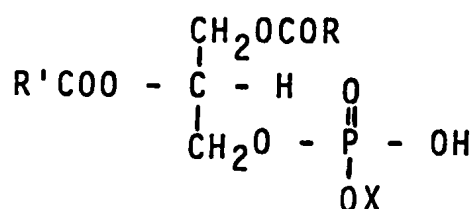
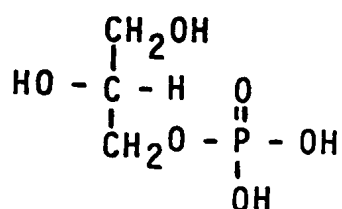


Tableau 2 : LES LIPIDES SIMPLES

1) Glycérophosphatides : esters de l'acide glycérophosphorique



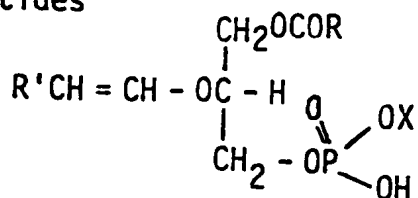
X = H : acides phosphatidiques

-X = $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{\oplus}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$; radical choline => Lécithines ou phosphatidyl-cholines (PC)

-X = $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{NH}_2$; radical éthanolamine => Céphalines ou phosphatidyl-éthanolamines (PE)

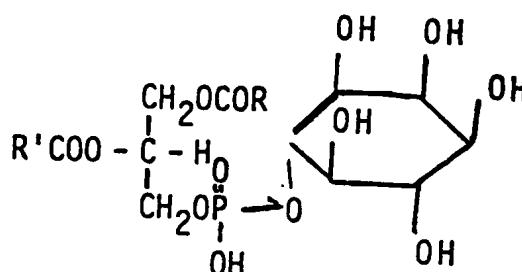
-X = $-\text{CH}_2 - \overset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$; radical sérine => Phosphatidyl-sérines (PS)

Acétal-phosphatides

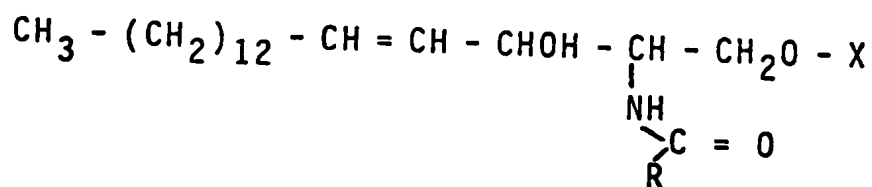


2) Inositophosphatides

Ex : Phosphatidyl-inositol



3) Sphingolipides : amides d'un acide gras et de sphingosine



liaison amide

X = H Céramides

X ≠ H Sphingolipides complexes

X = $-\overset{\text{OH}}{\text{P}}(=\text{O}) - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{(+)}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$; radical phosphoryl-choline => sphingomyélines

X = radical ose (s) => cérébrosides

X = radical ose (s) + un acide neuraminique => gangliosides

X = radical galactose sulfate => sulfatides

Tableau 3 : LES LIPIDES COMPLEXES

Le groupe des lipides complexes (Tableau 3) comprend :

- d'une part, les phospholipides, dans lesquels l'acide phosphorique fait partie intégrante de la molécule, qui se subdivisent en :
 - . phosphoglycérides dans lesquels radical orthophosphorique et acides gras sont liés au glycérol ;
 - . phosphoinositides où l'acide phosphorique est lié à l'inositol ;
 - . sphingomyélines dans lesquelles l'acide gras est lié à une base aminée, la sphingosine.
- d'autre part, les glucolipides ou cérébrosides contenant une molécule d'acide gras, une molécule de sphingosine et une molécule d'hexose.
- enfin, les dérivés isopréniques qui sont essentiellement des polyprènes dont la structure résulte de la condensation de plusieurs molécules d'isoprène (phytols, bactophénols et dolichols, caroténoïdes, xanthophylles et stérols).

2 - Biosynthèse et dégradation des glycérides et phosphatides

a) Les glycérides

Anabolisme. Comme indiqué dans le Tableau 4, la biosynthèse des glycérides est assurée par une trans-acylase responsable d'un transfert d'acyl-coenzyme A (acide gras acylé par le coenzyme A : $R-CO-CoA$) sur les fonctions hydroxyles du L- α -glycérophosphate. Ceci aboutit à la formation d'acide phosphatidique. Du détachement d'acide phosphorique sous l'action d'une phosphatase résulte la formation de diglycéride-1,2. Le transfert d'une troisième molécule d'acyl-coenzyme A conduit aux triglycérides.

Catabolisme. La dégradation des triglycérides est le fait des lipases qui détachent les acides gras.

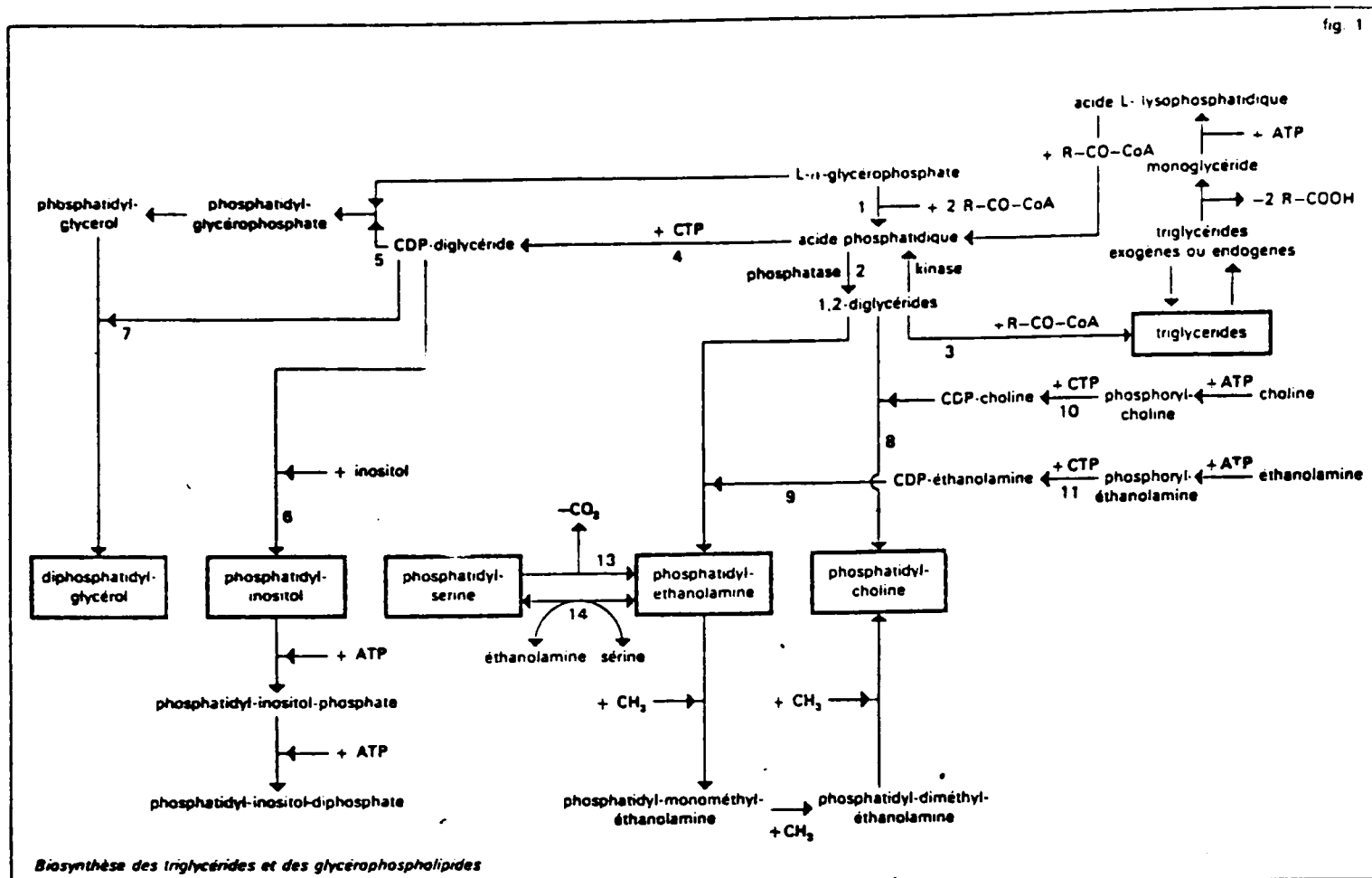
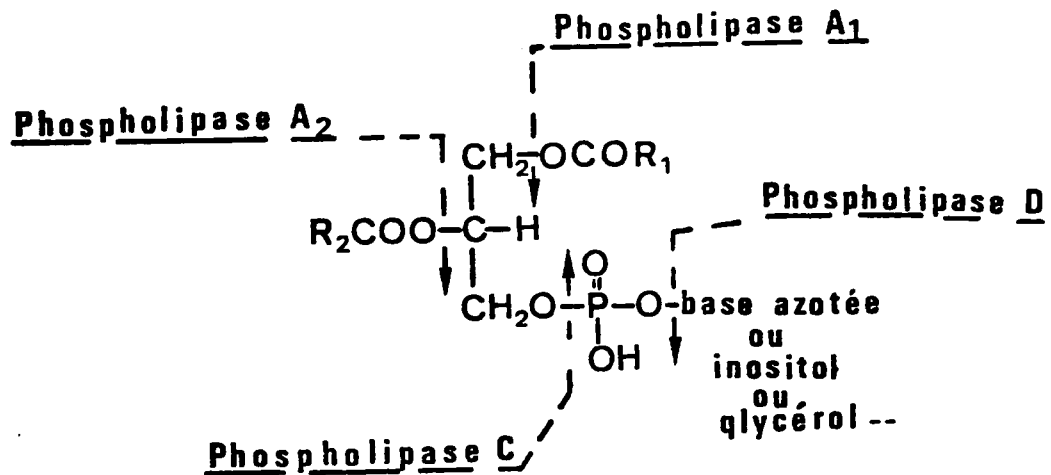


Tableau 4 : Biosynthèse des triglycérides et des glycérophospholipides

b) Les glycérophosphatides

Anabolisme. C'est encore l'acide phosphatidique synthétisé aisément à partir soit du glycérophosphate, soit du diglycéride en présence d'A.T.P., qui est à l'origine des glycérophosphatides azotés (P.C., P.S., P.E.) ou non.

Catabolisme. La dégradation des phosphatides s'effectue soit par l'action successive d'enzymes détachant les acides gras (phospholipases A₁, A₂ ou lysophospholipase), soit par libération directe de la base azotée avec formation d'acide phosphatidique (phospholipase D), ou encore par l'action d'une phospholipase C qui dissocie les phosphatides en un diglycéride et un dérivé phosphoré.



Le métabolisme des lipides est étroitement interdépendant de celui des protides et des glucides (Tableau 5).

3 - Répartition des lipides, leur rôle biologique

a) Les glycérides

Chez les végétaux, ils sont présents principalement dans la graine où ils constituent une réserve énergétique après s'être formés aux dépens de l'amidon.

Chez les animaux on rencontre des glycérides dans la fraction lipidique totale d'un organe. Ils participent à la vie cellulaire et à la structure au même titre que les autres lipides. On les trouve surtout dans les tissus adipeux où ils constituent les graisses de réserve.

b) Les phospholipides et glucolipides

Ils jouent un rôle essentiel dans la vie des cellules. On les trouve en abondance dans le système mitochondrial responsable du métabolisme respiratoire, dans les parois cellulaires où ils joueraient un rôle important dans les phénomènes de

perméabilité et dans les tissus physiologiquement essentiels comme le tissu nerveux et le foie.

Ces molécules sont plus hydrophiles que les glycérides, et surtout elles ont la propriété d'être attachées aux protéines sous forme d'associations complexes ("Cénapses lipoprotéidiques") dont l'étude est un des problèmes importants de la biochimie actuelle.

Dans bien des cas des enzymes ou des systèmes multi-enzymatiques sont associés à ces lipides ou sont liés à des membranes lipoprotéiques.

Leur rôle biologique est particulièrement important en tant que :

- éléments structuraux des membranes cellulaires, du noyau, des mitochondries ;
appareil de Golgi, gaines de myéline, etc... ;
- catalyseurs du transport des cations à travers les parois ;
- stabilisateurs des suspensions de glycérides et de cholestérol dans les lipoprotéines du plasma sanguin ;
- constituants essentiels de certaines enzymes ;
- constituants essentiels de plusieurs composés participant à la coagulation sanguine ;
- participants au mécanisme de sécrétion de certaines glandes.

C - Notre objectif

1 - But du travail

Nous avons montré le rôle extrêmement important joué par cette classe de composés dans la biologie. Ces dernières années ont vu les recherches dans ce domaine se développer de façon très rapide.

De nombreux problèmes restent cependant à résoudre. Le but de ce travail est de montrer que l'on peut synthétiser à la demande les différentes classes de glycérides et de glycérophospholipides marqués au carbone 14. Ces phospholipides et glycérides, de configuration et de composition chimique bien déterminées, ont servi / 130 / / 131 /, ou vont servir, à différentes équipes de chercheurs à mieux comprendre le rôle joué par les lipides aussi bien sur le plan structural que sur le plan métabolique.

Nous voulions, d'autre part, essayer d'apporter une contribution originale dans le domaine de la synthèse totale par voie chimique de phospholipides de configuration absolue naturelle.

La deuxième partie de ce travail vise à atteindre ce but.

2 - Remarques concernant le travail expérimental

Nous ne décrivons pas, dans les pages consacrées aux protocoles expérimentaux, les synthèses des intermédiaires dont la préparation est évidente ou déjà décrite, ce afin d'alléger cette partie du travail.

Les caractéristiques physico-chimiques de ces produits correspondent à celles attendues ou données par la littérature (n_D , α_D , F., Eb, ...), la preuve de leur structure est faite par l'interprétation des spectres de R.M.N. et de masse lorsqu'il a été possible de les effectuer (solubilité, volatilité), leur pureté étant systématiquement testée avant utilisation par C.P.V. ou C.C.M.

. Préparation de solvants anhydres :

- Le benzène anhydre est préparé par distillation sur anhydride phosphorique ;
- La pyridine est distillée après reflux sur potasse ;
- L'acétonitrile est distillé sur chlorure de calcium ;
- L'acétone est séchée sur carbonate de potassium et distillée ;
- Le tétrahydrofurane est après distillation sur potasse, stocké sur hydrure d'aluminium et de lithium ;
- L'éther anhydre est préparé par passage sur une colonne d'alumine basique suivie d'une colonne de tamis moléculaire 3Å⁰ ;

Les évaporations de ces solvants ont toutes été effectuées à l'évaporateur rotatif, sous vide de la pompe à palette, la température des mélanges à évaporer étant maintenue à 35°C.

Les spectres de R.M.N., sauf indications particulières, ont été effectués en solution dans le chloroforme deutérié.

Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au triméthylchlorosilane ($\delta = 0$).

Les C.C.M. ont toutes été faites sur plaque de silice (plaques Merck F 254, support souple ou en verre).

La révélation des chromatogrammes analytiques est effectuée de façon non spécifique par fixation de vapeurs d'iode et par pulvérisation d'acide sulfurique suivie du chauffage de la plaque.

Par contre, la pulvérisation de ninhydrine suivie du chauffage de la plaque permet la révélation spécifique de composés aminés (dérivés d'éthanolamine ou de sérine, tandis que le réactif de Dittmer / 127 / permet de visualiser les produits phosphorés.

. Après développement des chromatographies sur plaque préparative, la localisation (absorption U.V., autoradiographie) des différentes zones est effectuée. Le produit est extrait du gel de silice par entraînement par des solvants peu polaires (benzène, chloroforme, éther).

Dans les cas où un fort pourcentage de méthanol doit être rajouté pour désorber le produit à récupérer, de la silice peut être entraînée. L'éluat, après évaporation, est alors repris dans un solvant peu polaire et filtré sur filtre Millipore 5μ .

. Remarques concernant les molécules marquées obtenues :

Toutes les mises au point des méthodes ont été faites préalablement à la synthèse définitive, avec des dérivés D,L faiblement actifs.

Nous n'avons pas, pour des raisons pratiques, mesuré les α_D des produits marqués.

L'action satisfaisante de la phospholipase A_2 sur les produits finaux est le gage de la bonne configuration des produits synthétisés.

De même, les analyses élémentaires classiques C, H, O, N, ne peuvent être faites sur les dérivés marqués. Le fait d'obtenir, pour un produit radiochimiquement pur, une activité spécifique (déterminée par pesée et comptage) identique à celle du composé de départ est un critère de pureté chimique satisfaisant.

Les caractéristiques physico-chimiques de ces produits correspondent à celles attendues ou données par la littérature (n_D , α_D , F., Eb, ...), la preuve de leur structure est faite par l'interprétation des spectres de R.M.N. et de masse lorsqu'il a été possible de les effectuer (solubilité, volatilité), leur pureté étant systématiquement testée avant utilisation par C.P.V. ou C.C.M.

. Préparation de solvants anhydres :

- Le benzène anhydre est préparé par distillation sur anhydride phosphorique ;
- La pyridine est distillée après reflux sur potasse ;
- L'acétonitrile est distillé sur chlorure de calcium ;
- L'acétone est séchée sur carbonate de potassium et distillée ;
- Le tétrahydrofurane est après distillation sur potasse, stocké sur hydrure d'aluminium et de lithium ;
- L'éther anhydre est préparé par passage sur une colonne d'alumine basique suivie d'une colonne de tamis moléculaire 3Å ;

Les évaporations de ces solvants ont toutes été effectuées à l'évaporateur rotatif, sous vide de la pompe à palette, la température des mélanges à évaporer étant maintenue à 35°C .

Les spectres de R.M.N., sauf indications particulières, ont été effectués en solution dans le chloroforme deutérié.

Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au triméthylchlorosilane ($\delta = 0$).

Les C.C.M. ont toutes été faites sur plaque de silice (plaques Merck F 254, support souple ou en verre).

La révélation des chromatogrammes analytiques est effectuée de façon non spécifique par fixation de vapeurs d'iode et par pulvérisation d'acide sulfurique suivie du chauffage de la plaque.

Par contre, la pulvérisation de ninhydrine suivie du chauffage de la plaque permet la révélation spécifique de composés aminés (dérivés d'éthanolamine ou de sérine, tandis que le réactif de Dittmer / 127 / permet de visualiser les produits phosphorés.

. Après développement des chromatographies sur plaque préparative, la localisation (absorption U.V., autoradiographie) des différentes zones est effectuée. Le produit est extrait du gel de silice par entraînement par des solvants peu polaires (benzène, chloroforme, éther).

Dans les cas où un fort pourcentage de méthanol doit être rajouté pour désorber le produit à récupérer, de la silice peut être entraînée. L'éluat, après évaporation, est alors repris dans un solvant peu polaire et filtré sur filtre Millipore 5 μ .

. Remarques concernant les molécules marquées obtenues :

Toutes les mises au point des méthodes ont été faites préalablement à la synthèse définitive, avec des dérivés D,L faiblement actifs.

Nous n'avons pas, pour des raisons pratiques, mesuré les α_D des produits marqués.

L'action satisfaisante de la phospholipase A₂ sur les produits finaux est le gage de la bonne configuration des produits synthétisés.

De même, les analyses élémentaires classiques C, H, O, N, ne peuvent être faites sur les dérivés marqués. Le fait d'obtenir, pour un produit radiochimiquement pur, une activité spécifique (déterminée par pesée et comptage) identique à celle du composé de départ est un critère de pureté chimique satisfaisant.

CHAPITRE I

SYNTHESE DE GLYCERIDES

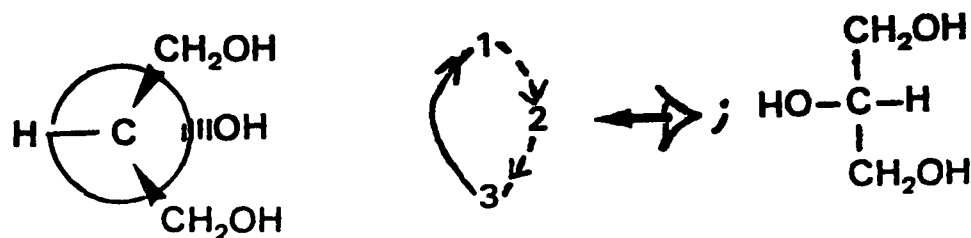
- Nomenclature

Il est nécessaire de définir d'une façon précise les différentes positions que peuvent prendre les esters d'acides gras, identiques ou différents dans leur chaîne polycarbonée, sur le squelette glycérol.

Les deux positions correspondant aux hydroxyles primaires ne sont, en effet, pas stéréochimiquement équivalentes dans les réactions enzymatiques.

Une convention est donc nécessaire pour numéroter les trois groupes hydroxyles. Cependant, puisque les deux extrémités de la molécule glycérol sont des hydroxyles primaires chimiquement équivalents, toute numération est essentiellement arbitraire.

La convention de HIRSCHMANN / 1 / a maintenant été universellement adoptée : Si l'atome de carbone est vu avec la liaison C - H opposée à l'observateur, chacune des trois autres liaisons conduit à un groupe hydroxyle. HIRSCHMANN a proposé que les trois groupes hydroxyles vus de cette façon soient numérotés dans l'ordre du sens des aiguilles d'une montre avec la position 2 déjà définie par l'hydroxyle attaché directement à l'atome de carbone central. Ceci est équivalent à une projection de Fischer dans laquelle l'hydroxyle central est localisé sur la partie gauche de la chaîne carbonée du glycérol.



Une façon plus simple de percevoir ce concept est de définir que tous les glycérides sont dénommés comme étant des dérivés du L-glycéraldéhyde et que les atomes de carbone sont notés avec la séquence conventionnelle de haut en bas. Le préfixe "sn" ("stéréospecifically numbered") est alors inclus dans tous les noms de dérivés du glycérol dans lesquels la convention de numérotation de HIRSCHMANN est utilisée / 2 // 3 /.

Cette nomenclature "sn" est préférée aux notations conventionnelles D et L ou R et S car elle permet de définir la stéréochimie des réactions dans le domaine des glycérolipides de la façon la plus simple et la moins ambiguë.

D'autres préfixes sont aussi souvent utilisés pour définir les positions des substituants dans le domaine des glycérides. Ainsi la lettre α fait référence aux positions sn 1 et sn 3 tandis que β correspond à la position sn 2.

Pour plus de clarté, dans toute la suite de notre travail, nous utiliserons la nomenclature de HIRSCHMANN définie précédemment.

La configuration absolue devant être fixée, il est absolument nécessaire, lors de toutes les étapes de la synthèse totale par voie chimique de glycérolipides ou de glycérophospholipides de fixer la configuration absolue du dérivé du glycérol servant à ces synthèses.

Le composé de base le plus largement utilisé / 4 / / 5 / pour la synthèse de ces produits naturels est le acétone D-glycérol ou isopropylidène-1,2 sn-glycérol, que nous avons préparé.

A - Schémas de synthèse

1 - Synthèse du D-acétone-glycérol (I) (ou isopropylidène-1,2 sn-glycérol)

La synthèse du acétone D-glycérol (I) est effectuée par coupure oxydative (par le métapériodate de sodium / 7 / / 8 / ou par le tétraacétate de plomb / 6 / / 12 / du diisopropylidène-1,2 - 5,6-D-mannitol / 9 / / 10 / 6 / / 11 / / 4 / suivie de la réduction de l'aldéhyde ainsi formée / 6 / / 7 / / 8 /.

Le diisopropylidène D-mannitol préparé suivant la référence / 6 / est oxydé par le métapériodate de sodium / 8 / puis l'acétone-glycéraldéhyde est réduit par le borohydrure de sodium / 8 / pour conduire à l'acétone D-glycérol (I) (Schéma 1).

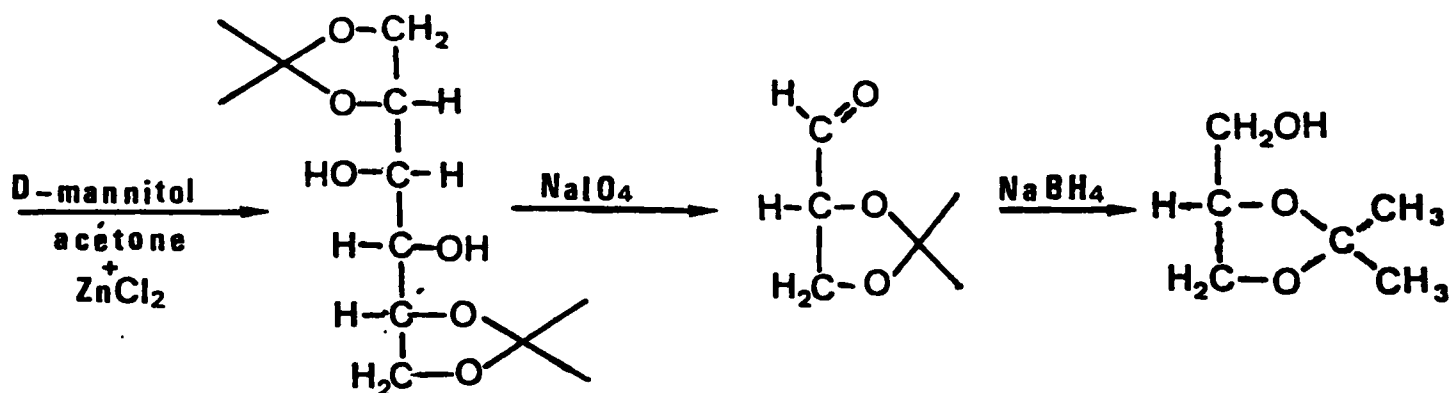


Schéma 1 - Synthèse de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol.

2 - Synthèse du [palmitoyl (^{14}C)-16] -1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)

Ce monoglycéride nous avait été demandé par un laboratoire de biochimie du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble. La position de marquage devait impérativement être sur un des carbones de la chaîne de l'acide gras autre que le carbonyle, des décarboxylases pouvant en effet être présentes dans le milieu biologique étudié et ainsi fausser les mesures effectuées.

L'activité spécifique de 0,5 mCi/mMole nous avait été aussi précisée.

Le schéma de synthèse que nous avons choisi de suivre est le Schéma 2.

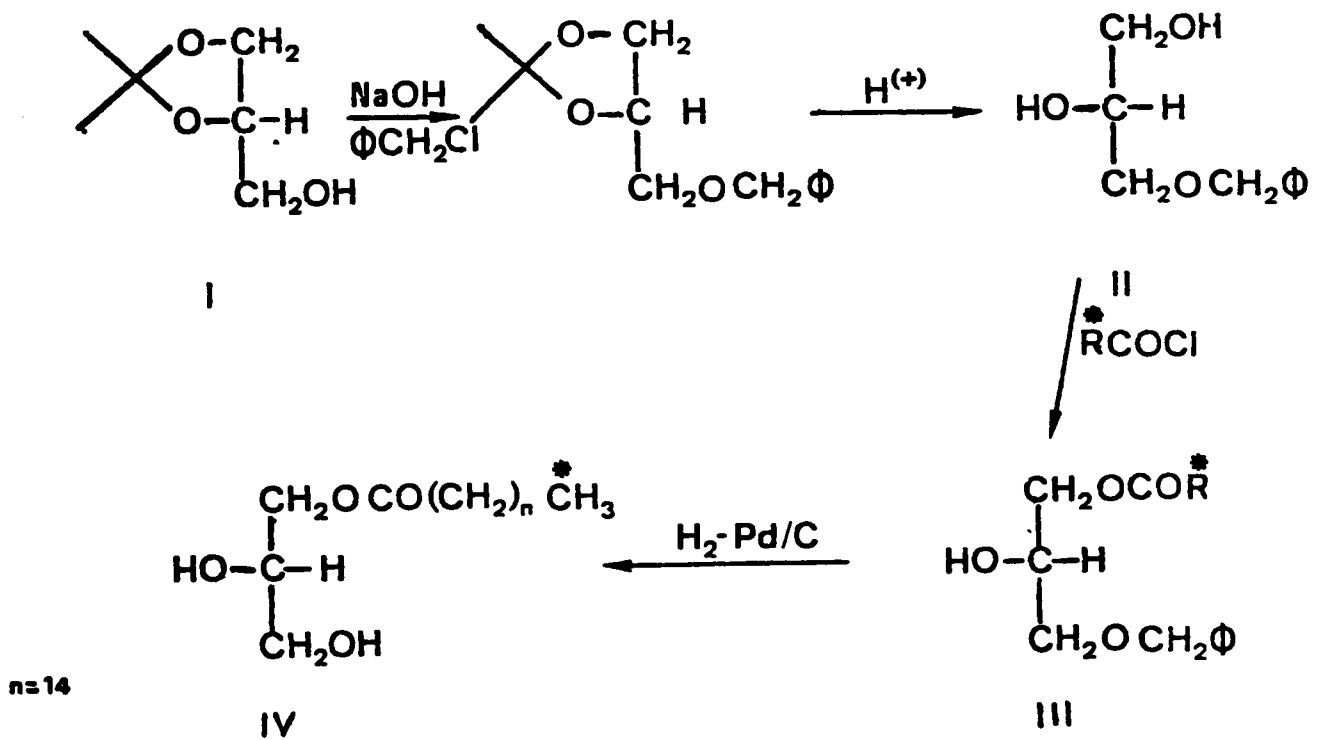


Schéma 2 - Préparation du palmitoyl-1 sn-glycérol.

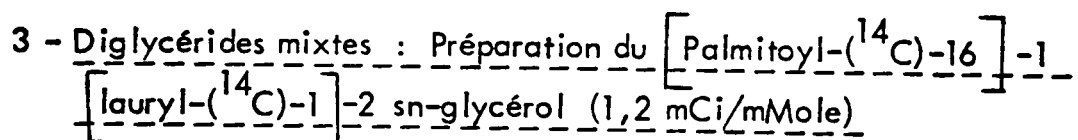
Le benzyl-3 isopropylidène-1,2 sn-glycérol / 13 / préparé à partir du sel de sodium, de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol est hydrolysée en milieu acide puis estérifié.

L'estérification du benzyl-3 sn-glycérol (II) a été effectuée selon deux méthodes avec toujours un très net défaut du dérivé d'acide marqué par rapport à II :

- par le chlorure de l'acide palmitique (^{14}C)-16 préparé par action du chlorure de thionyle sur l'acide correspondant. Le rendement du produit III par rapport à l'acide est de 70 %.
- par addition du sel de pyridinium à l'acide palmitique en présence du chlorure de l'acide triisopropyl-benzène-sulfonique (T.P.S.) / 62 / avec un rendement de seulement 20 % par rapport à l'acide. Cette méthode, dont le rendement est nettement inférieur à celui de celle utilisant le chlorure d'acide, a été abandonnée.

!! faut noter qu'il s'est formé environ 10 % d'un composé identifié par R.M.N. et S.M. comme le dérivé dipalmitoyl-1,2 benzyl sn-glycérol.

La débenzylation de III est effectuée par hydrogénation catalytique sur charbon palladié. Elle conduit au palmitoyl-1 sn-glycérol (IV).



Les diglycérides-1,2 ont une importance biologique très grande car ils sont les précurseurs des glycérophosphatides lors de leur biosynthèse.

Ce diglycéride-1,2 mixte a été synthétisé par action du chlorure de l'acide laurique- $(^{14}\text{C})\text{-1}$ sur le $\left[\text{palmitoyl-}(^{14}\text{C})\text{-16} \right]\text{-1}$ benzyl-3 sn-glycérol (III) avec un rendement de 52 % puis déprotection par hydrogénolyse (rendement 95 %) en présence de palladium sur charbon (Schéma 3).

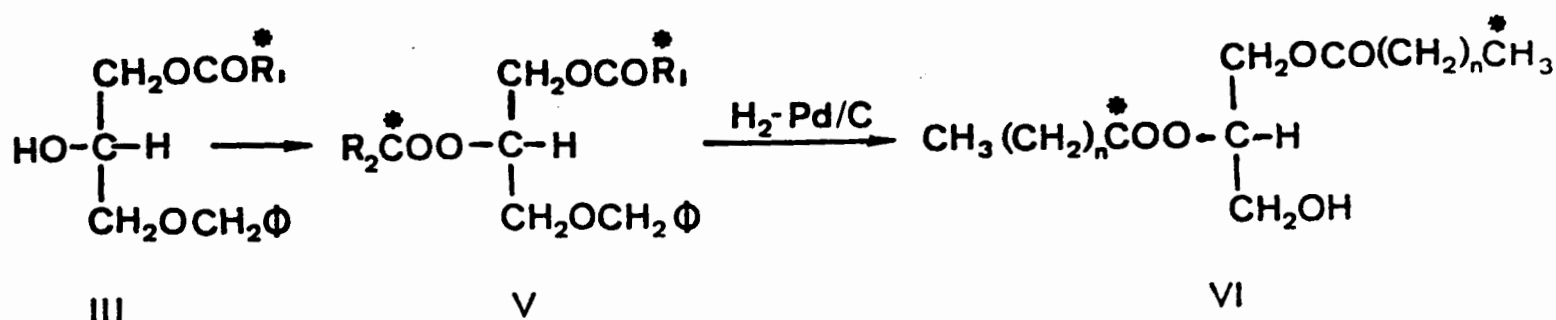
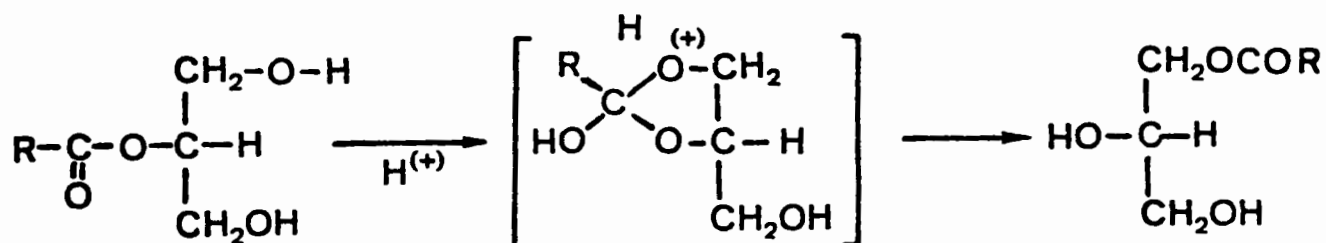


Schéma 3 - Préparation du palmitoyl-1 lauryl-2 sn-glycérol.

Au cours de cette débenzylation douce, en milieu neutre, aucune migration de la position sn-2 à sn-3 n'est à craindre.

En milieu acide ou basique, par contre, il est bien connu que cette migration se fait par un mécanisme de transfert intramoléculaire / 16 /.



4 - Synthèse du [(palmitoyl-(¹⁴C)-1]-3 sn-glycérol 0,5 mCi/mMole

La préparation de ce composé VIII isomère optique du palmitoyl-1 sn-glycérol a été effectuée par estérification à l'aide du chlorure d'acide palmitique-(¹⁴C)-1 de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol (cf. Schéma 4) avec un rendement de 90 %. D'autres essais d'acylation en présence de T.P.S. avaient donné un rendement de 30 % seulement.

L'enlèvement du groupe isopropylidène a été difficile à réaliser par traitement dans l'éther en présence d'acide chlorhydrique. Cette résistance des

éthers isopropylidènes d'esters d'acides gras du glycérol vis-à-vis des acides est connue / 14 /.

L'hydrolyse du groupe isopropylidène des isopropylidène-acyl-glycérols est effectuée en général par traitement par l'acide borique dans le triméthyl-borate / 14 // 15 /. Cette méthode est cependant limitée aux dérivés où le nombre de carbones du groupe acyle est inférieur à 12.

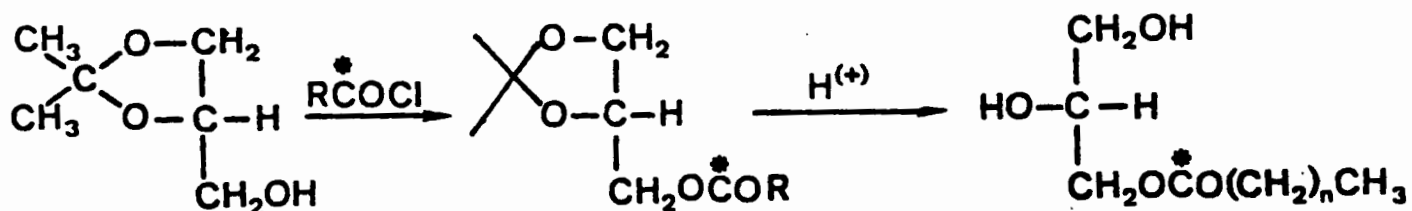


Schéma 4 - Préparation de monopalmitoyl-3 sn-glycérol.

REMARQUE

Suivant un schéma réactionnel tout à fait identique à celui-ci, le palmitoyl-1 sn-glycérol peut être préparé. Il suffit de prendre comme composé de départ le L-acétone-glycérol (ou isopropylidène-2,3 sn-glycérol préparé à partir de L-mannitol. Le L-mannitol n'étant pas commercialisé est synthétisé à partir de L-mannose, lui-même préparé à partir de L-arabinose / 17 / par l'intermédiaire de la phénylhydrazone du L-mannose.

B - Modes opératoires

1 - D-acétone-glycérol (I)

Suivant la méthode décrite dans la référence / 6 /, le diisopropylidène-1,2 - 5,6-D-mannitol est obtenu et recristallisé dans l'éther de pétrole, puis coupé par le métapériodate suivant / 8 / et réduit par la borohydrure / 8 /.

L'acétone D-glycérol après distillation (83°C sous 20 mm de mercure) ne donne plus qu'un seul pic en C.P.V. (silicone OV₁ chauffé à 135°C).

Les valeurs de l'indice de réfraction et du pouvoir rotatoire spécifique sont conformes à celles données dans la littérature :

$$n_D^{22} = 1,4349 \quad , \quad \alpha_D^{25} = + 13,9 \quad (C = 1)$$

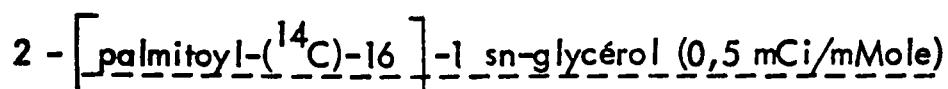
- R.M.N. (sans solvant)

2 singulets	6 H	1,25 ppm	2 méthyles de l'isopropylidène
1 massif	6 H	centré à 3,7 ppm	5 H du squelette et H de l'hydroxyle

- S.M.

m/e 117 , 62 % (M-CH₃)⁺ ; m/e 101 , 28 % (M-CH₂OH) ; m/e 59 , 30 % (M-CH₃COCH₃)⁺ ; m/e 57 , 30 % ; m/e 43 , 100 % (CH₃CO)⁺ ; m/e 31 , 30 % (CH₂OH)⁺.

Il est absolument nécessaire d'utiliser, pour les manipulations suivantes, ce produit fraîchement préparé et distillé; le pouvoir rotatoire décroît en effet lentement au cours de stockage / 15 /.



a) Isopropylidène-1,2 benzyl-3 sn-glycérol

7,2 mg (130 mMoles) d'acétone D-glycérol et 5,2 g (130 mMoles) de soude pulvérisée en boîte à gants sont chauffés sous atmosphère d'azote pendant 2 h 30 avec une bonne agitation.

Laisser refroidir le mélange et ajouter ensuite 15 ml de benzène anhydre puis lentement ajouter le chlorure de benzyle (14 ml, 110 mMoles) dissous dans 10 ml de benzène.

Laisser au reflux du benzène 3 h 30.

Après refroidissement, filtrer les sels, laver avec du benzène puis chasser le solvant par distillation à la pression atmosphérique.

Par distillation on recueille sous vide de la pompe à palette la fraction 108-110°C (17,7 g) identifiée par R.M.N. et S.M. Rendement : 60 %.

- R.M.N.

2 singulets	6 H	1,3 ppm	2 méthyles de l'isopropylidène
1 massif	5 H	3,9 ppm	5 H du squelette glycérol
1 singulet	2 H	4,5 ppm	CH ₂ benzyliques
1 singulet	5 H	7,2 ppm	5 H benzéniques

- S.M.

m/e 222 , 2 % (M⁺) ; m/e 207 , 13 % (M-Me)⁺ ; m/e 164 , 25 % (M-CO(CH₃)₂)⁺ ; m/e 101 , 43 % (M-CH₂OCH₂Φ)⁺ ; m/e 91 , 100 % (Φ-CH₂⁺) ; m/e 43 , 41 % (CH₃CO)⁺.

b) Benzyl-3 sn-glycérol

8 g (36 mMoles) d'isopropylidène benzyl-glycérol dissous dans l'éthanol aqueux sont filtrés sur une colonne Dowex 50 H⁺ (25 cm x 1,2 cm).

Le filtrat est distillé d'abord sous vide de la trompe à eau, puis le résidu est distillé sous vide de la pompe à palette.

On isole 4 g d'un produit Eb = 120°C (62 % rendement) caractérisé par R.M.N. et S.M.

- R.M.N. dans D₂O

1 massif	5 H	3,8 ppm	H du squelette glycérol
1 singulet	2 H	4,5 ppm	CH ₂ benzyliques
1 singulet	5 H	7,3 ppm	protons benzéniques

- S.M.

m/e 182, 16 % (M⁺) ; m/e 107, 40 % (ΦCH₂O)⁺ ; m/e 91, 100 % (Φ-CH₂)⁺ et (M-ΦCH₂)⁺ ; m/e 31, 35 % (CH₂OH)⁺.

c) Estérification du benzyl-3 sn-glycérol

Vu le prix de revient élevé de l'acide palmitique (¹⁴C)-16 il avait été fait auparavant plusieurs essais avec de l'acide palmitique (¹⁴C)-1 en vue de déterminer les meilleures conditions de réaction.

En boîte à gants, à 728 mg (4 mMoles) de benzyl-3 sn-glycérol, dissous dans 3 ml de benzène anhydre, et 4 mMoles (0,4 ml) de pyridine anhydre, ajouter lentement le chlorure d'acide palmitique-(¹⁴C)-16 (2 mMoles, 1 mCi) dissous dans 2 ml de benzène avec agitation magnétique à température ambiante.

La réaction est arrêtée après 4 jours à température ambiante par addition d'un mélange eau/glace. Ajouter du benzène, extraire en ampoule à décanter et recueillir la phase organique que l'on lave par trois fois.

Une chromatographie sur plaque préparative (hexane / éther : 3 / 2) permet de récupérer 590 mg d'un produit (RF = 0,3) dont l'activité est 703 μ Ci (70 % de rendement par rapport à l'acide) caractérisé par S.M. et R.M.N.

- S.M.

m/e 420 , 8 % (M^+) ; m/e 329 , 4 % ($M-\Phi CH_2$)⁺ ; m/e 313 , 9 % ($M-\Phi CH_2 O$)⁺ ;
m/e 239 , 19 % ($R-CO$)⁺ ; m/e 181 , 47 % ($M-RCOOH$)⁺ ; m/e 107 , 23 %
($\Phi CH_2 O$)⁺ ; m/e 91 , 100 % (ΦCH_2)⁺.

- R.M.N. $CDCl_3 + D_2O$

1 singulet	5 H	7,3 ppm	protons benzéniques
1 singulet	2 H	4,5 ppm	CH ₂ benzylique:
1 massif	3 H	3,7 ppm	CH ₂ (position sn-3) et H du squelette
1 massif	2 H	3 ppm	CH ₂ position sn-1
1 massif	2 H	2,3 ppm	1 CH ₂ en α du CO
1 singulet	26 H	1,3 ppm	13 CH ₂ de l'acide gras
1 massif	3 H	0,9 ppm	CH ₃ de l'acide gras

d) [palmitoyl-(¹⁴C)-16] -1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole)

400 mg (435 μ Ci) de monopalmitoyl-1 benzyl-3 sn-glycérol dissous dans 5 ml d'éthanol absolu sont mis en présence de Pd/C 10 % sous hydrogène pendant 4 h, à température ambiante.

Les chromatographies (C.C.M.) $CHCl_3$, MeOH 5 % (RF : 0,3) et $CHCl_3$ /Benzène 7/3 indiquent que la réaction s'est faite à 100 % et que le produit est radiochimiquement propre.

On recueille après filtration sur Millipore (téflon 5μ), lavage, et évaporation de l'éthanol 228 mg, 422 μ Ci de [palmitoyl-(^{14}C)-16] -1 sn-glycérol d'activité spécifique 0,495 mCi/mMole sous forme d'un beau solide blanc. Le rendement actif est de 97 % par rapport au dérivé benzylé.

Le spectre de masse confirme la structure.

m/e 330, 37 % (M^+) ; m/e 299, 99 % ($\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}$) $^+$; m/e 256 (RCOOH) $^+$; m/e 255, 95 % (RCOO) $^+$, 239, 100 % (RCO) $^+$.

Le pic m/e 270, 55 % ($\text{CH}_2\text{OCOR} + \text{H}$) $^+$ permet de confirmer la position de l'acide palmitique sur le C_1 du squelette glycérol.

e) Caractérisation du dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol

Il faut signaler que dans les essais précédents, lorsque le rapport chlorure d'acide/alcool est 2/3 on note l'apparition en C.C.M. (R.F. = 0,9 dans hexane/éther: 3/2) d'un produit en quantité non négligeable (30 % activité totale) que l'on isole par chromatographie sur plaque préparative.

Le spectre de masse présentant un pic m/e 551 ($\text{M}-\text{OCH}_2\text{O}$) $^+$ mais pas de pic moléculaire permet de définir la structure :

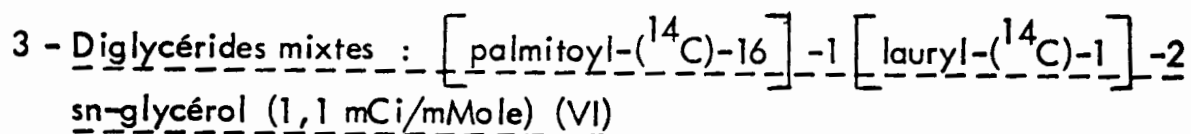


Cette structure est confirmée par le spectre de R.M.N.

1 singlet	5 H	7,2 ppm	aromatiques
1 massif	1 H	5,2 ppm	H du squelette glycérol
1 doublet (J = 0,5hz)	2 H	4,45 ppm	CH_2 benzylique

1 massif	2 H	4,2 ppm	CH ₂ (position sn-3)
1 doublet (J = 5 hz)	2 H	5,55 ppm	CH ₂ (position sn-1)
1 massif	4 H	2,3 ppm	2 CH ₂ en α du CO
1 singulet	52 H	1,25 ppm	26 CH ₂ des acides gras
1 massif	6 H	0,9 ppm	2 CH ₃ des acides gras

Le fait de mettre 2,2 équivalents de chlorure d'acide pour un équivalent de benzylglycérol permet d'obtenir avec un bon rendement ce dérivé et, par suite, après débenzylation catalytique la dipalmitine-1,2, RF : 0,9, dans CHCl₃ MeOH 4 %. Le dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol nous sera utile pour la deuxième partie de ce travail.



En boîte à gants à 242 mg (0,57 mMole, 268 μCi) de palmitoyl-1 benzyl-3 sn-glycérol dissous dans 1,5 ml de benzène anhydre et 0,2 ml (2 mMoles) de pyridine anhydre ajouter 0,8 mMole (0,5 mCi de chlorure d'acide laurique-¹⁴C)-1 (A.S. = 0,6 mCi/mMole) dissout dans 1 ml de benzène.

Après arrêt de la réaction on recueille par chromatographie sur plaque préparative hexane/éther : 3/2 (RF : 0,7) 225 mg d'un produit blanc donc l'activité est 400 μCi, 52 % par rapport à l'activité totale. A.S. = 1,07 mCi/mMole.

La S.M. confirme la structure attendue (V).

m/e 602 , 1 % (M⁺) ; m/e 495 , 9 % (M-ΦCH₂O)⁺ ; m/e 256 (Ac. Palm.)⁺ ;
 m/e 183 , 18 % CH₃(CH₂)₁₀CO⁺ ; m/e 91 , 100 % (ΦCH₂)⁺.

La débenzylation catalytique est effectuée sur 170 mg (300 μCi) comme précédemment dans l'éthanol absolu en présence de Pd/C.

Le diglycéride (VI) est caractérisé par spectrométrie de masse.

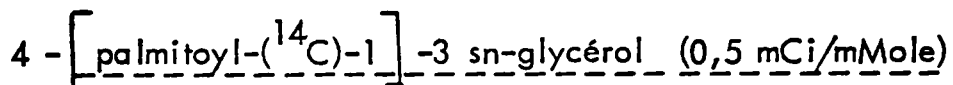
m/e 512 , 2 % , M^+ ; m/e 495 , 22 % , $(M-OH)^+$; m/e 494 , 60 % , $(M-H_2O)^+$;
m/e 313 , 68 % $(M-CH_3(CH_2)_{10}COO)^+$; m/e 257 $(M-CH_3(CH_2)_{14}COO)^+$, 100 % ;
m/e 36 % $(M-CH_3(CH_2)_{14}COOCH_2)^+$ preuve de la position en 1 de l'acide
palmitique ; m/e 239 , 83 % $(CH_3(CH_2)_{14}CO)^+$; m/e 183 , 91 % $(CH_3(CH_2)_{10}CO)^+$.

On recueille 140 mg (275 μ Ci, A.S. = 1,1 mCi/mMole).

Le rendement actif est supérieur à 95 % par rapport au dérivé benzylé.

- C.C.M.

RF = 0,7 dans le solvant chloroforme à 4 % de méthanol.



a) Isopropylidène-1,2 palmitoyl-3 sn-glycérol

En boîte à gants, à 4 mMoles d'isopropylidène-1,2 sn-glycérol dissous dans 3 ml de benzène anhydre et 0,4 ml de pyridine anhydre, ajouter lentement 2 mMoles (1 mCi) de chlorure d'acide palmitique (^{14}C)-1 dissous dans 2 ml de benzène anhydre.

La réaction est suivie par C.C.M. (CHCl_3 , MeOH 0,5 %) et (hexane/éther : 3/2). L'agitation magnétique à température ambiante est maintenue pendant 4 jours.

Au bout de ce temps le rendement de 90 % (déterminé par l'enregistrement des C.C.M.) étant atteint, arrêter la réaction par un mélange eau/glace, extraire la phase organique, la laver et la sécher.

Une chromatographie sur plaque préparative (hexane/éther : 3/2) permet de récupérer 630 mg soit 1,7 mMole (850 μ Ci ; A.S. = 0,5 mCi/mMole) d'une huile qui cristallise spontanément.

- C.C.M. de contrôle

hexane / éther : 3/2

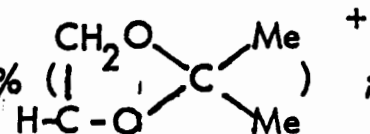
RF = 0,75

CHCl₃ , 0,5 % MeOH

RF = 0,8

La structure VII est caractérisée par :

- S.M.

m/e 356 , 25 % ; m/e 355 , 100 % (M-15)⁺ ; m/e 101 , 33 %  ;

m/e 57 , 29 % ; m/e 43 , 42 % (CH₃CO)⁺.

- R.M.N.

Massif	3 H	4,05 ppm	CH ₂ (position 1) et CH
Massif	2 H	2,95 ppm	CH ₂ (position 3)
Massif	2 H	2,3 ppm	CH ₂ en α du CO
Singulet	26 H	1,3 ppm	13 CH ₂ de l'acide gras
2 singulets	6 H	1,25 ppm	2 CH ₃ de l'isopropylidène
Massif	3 H	0,9 ppm	1 CH ₃ de l'acide gras

b) Hydrolyse du groupe isopropylidène

1 mMole (0,5 mCi) du composé VII est dissoute dans 15 ml d'éther.

La solution est amenée à la température de - 15°C.

10 ml de HCl concentré (préalablement refroidis) sont ajoutés à la solution précédente avec une bonne agitation.

Après 30 minutes à 0°C, 100 ml d'eau sont ajoutés et le mélange est agité de temps en temps.

Après 30 minutes, la phase étherée est récupérée, lavée, évaporée et fractionnée par chromatographie préparative sur plaque (hexane/éther : 3/2).

Le produit RF : 0,3 (60 % de l'activité) est isolé avec un rendement de 50 % par rapport au dérivé protégé (75 mg, 0,25 mCi, A.S. = 0,5 mCi/mMole).

Les spectres de R.M.N. et de masse effectués sur ce composé sont identiques à ceux effectués sur le dérivé palmitoyl-1 sn-glycérol.

CHAPITRE II

SYNTHÈSE DE PHOSPHOLIPIDES MARQUÉS PAR ADAPTATION DES MÉTHODES CLASSIQUES A LA SYNTHÈSE DE MOLECULES RADIOACTIVES

La synthèse de phospholipides marqués au carbone 14 peut être réalisée de deux façons :

- par voie biologique
- par voie chimique

Par voie biologique, les méthodes utilisées consistent à faire acyler in vitro ou in vivo (acyl-transférases) des précurseurs de la biosynthèse des phospholipides après avoir introduit dans le milieu des acides gras marqués. Ces méthodes, d'un rendement radioactif négligeable, ne permettent le plus souvent d'obtenir que des lipides faiblement marqués, avec une distribution de l'activité mal définie.

Les méthodes chimiques, par contre, présentent l'avantage de fournir des dérivés dont la structure est bien définie, et possédant une radioactivité assez élevée nécessaire à certains travaux.

Les méthodes actuellement utilisées pour la synthèse chimique des diesters de glycérophosphatides (céphaline, lécithine, phosphatidyl-sérine, ...) consistent à construire successivement les différentes parties structurales de la molécule (esters phosphoriques des bases azotées ou des acides aminés, acides gras), à partir de nombreux dérivés asymétriques du glycérol.

La plupart des méthodes décrites ont été répertoriées dans plusieurs revues / 18 à 30 /.

Elles peuvent être divisées en deux grandes classes :

- Synthèses à partir de structure 1,2-diglycéride : dans ce cas l'introduction de l'acide aliphatique sur le dérivé du glycérol précède la phosphorylation.
- La synthèse à partir d'esters glycérophosphoriques est caractérisée par une démarche opposée : phosphorylation puis estérification.

A l'intérieur de chacune de ces classes de synthèse, de nombreux schémas sont possibles. Pour notre part, après une étude bibliographique approfondie et tenant compte des exigences propres à la synthèse de molécules marquées (rendement radioactif), nous avons sélectionné un certain nombre de méthodes et les avons adaptées à la préparation de composés marqués.

Dans les pages suivantes nous avons regroupé nos différents essais sous deux titres :

- Synthèses à partir du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol.
- Synthèses à partir de dérivés de glycérophosphoryl-choline ou éthanolamine.

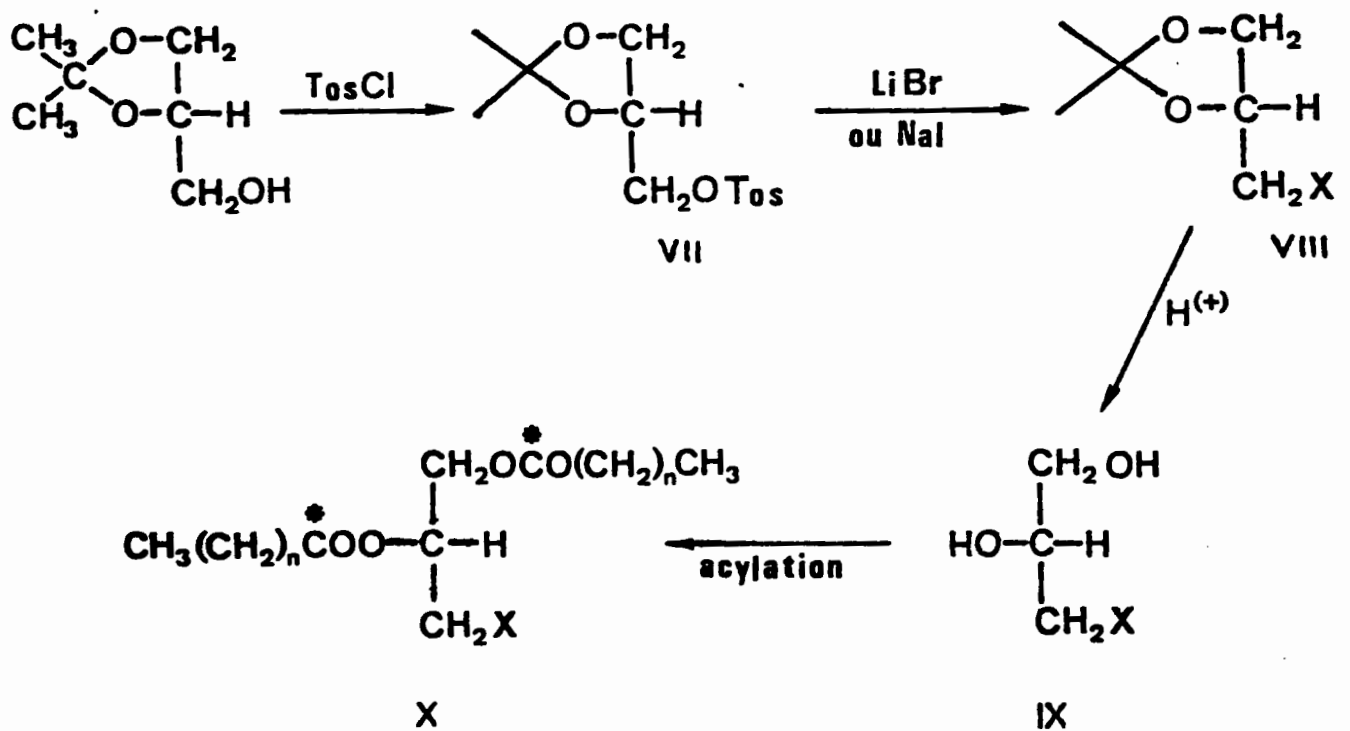
Si les idées de base ne sont pas très originales, la grande difficulté lors de l'adaptation de ces méthodes classiques à la synthèse radioactive a résidé dans la recherche de conditions expérimentales, de modes de purification et d'identification des composés synthétisés qui sont (vu les faibles quantités de produit) souvent très différentes de la publication originale.

A - Schémas de principe

I - Préparation de glycérophosphatides marqués à partir de diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol

1 - Préparation du dérivé halogéné

La préparation de diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol présente beaucoup moins de difficultés que celle des 1,2-diglycérides (Schéma 5).



X = Br, I.

Tos = pCH₃SO₂.

Schéma 5 - Préparation du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol.

Ces composés sont préparés à partir d'isopropylidène-1,2 sn-glycérol par une suite de réactions dont la dernière est l'estérification, ce qui, dans notre cas, est intéressant car il faut toujours rechercher les schémas faisant intervenir le moins d'étapes actives.

Le remplacement du groupe hydroxyle par un halogène (brome ou iode) (IX) est effectué par l'intermédiaire du dérivé p. toluène-sulfonylé / 31 à 38 / (Schéma 5).

2 - Détermination de la méthode à retenir pour l'estérification de dérivés du glycérol

Dans le domaine de la chimie des phosphatides, l'estérification est en général effectuée soit à l'aide du chlorure d'acide, soit à l'aide d'anhydride d'acide (préparée par action de la D.C.C. sur l'acide) en présence du sel de tétraéthyl-ammonium de l'acide selon la méthode de LAPIDOT / 60 - 61 /.

La méthode d'estérification par l'anhydride d'acide a été à priori rejetée pour les synthèses actives car elle nécessite un trop gros excès de dérivé d'acide (plus de 6 équivalents par rapport aux hydroxyles à estérifier).

Nous avons recherché dans la littérature différentes méthodes d'estérification sous conditions douces et les avons appliquées à notre problème :

- Estérification à l'aide du chlorure de l'acide triisopropyl-benzène-sulfonique (T.P.S.) ;
- Estérification à l'aide de carbonyl-diimidazole.

Ces deux méthodes utilisées lors d'acylations délicates / 62 - 63 / à notre connaissance n'avaient jamais été utilisées pour l'estérification de dérivés du glycérol par des acides gras.

- Estérification par le chlorure d'acide gras.

C'est la méthode la plus couramment employée.

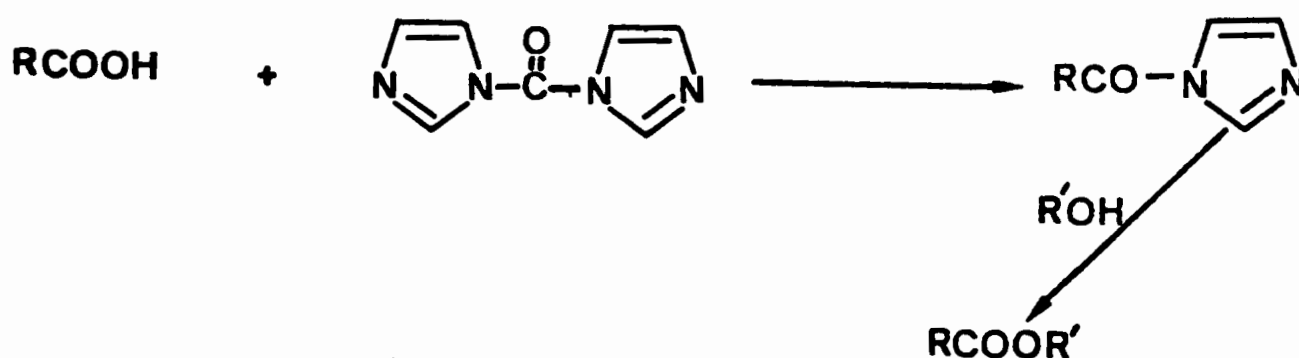
a) Utilisation du chlorure de l'acide trisopropyl-benzène-sulfonique (T.P.S.)

L'activation d'un acide carboxylique par le T.P.S. en présence de pyridine permet l'acylation douce de groupes hydroxyles / 62 /.

L'acylation du bromo-sn-glycérol par l'acide palmitique activé par le T.P.S., dans la pyridine, est effectuée à température ambiante pendant 3 jours, en conditions anhydres. Le rendement en dipalmitoyl-bromo-glycérol est de 60 à 70 %.

b) Utilisation du carbonyl-diimidazole

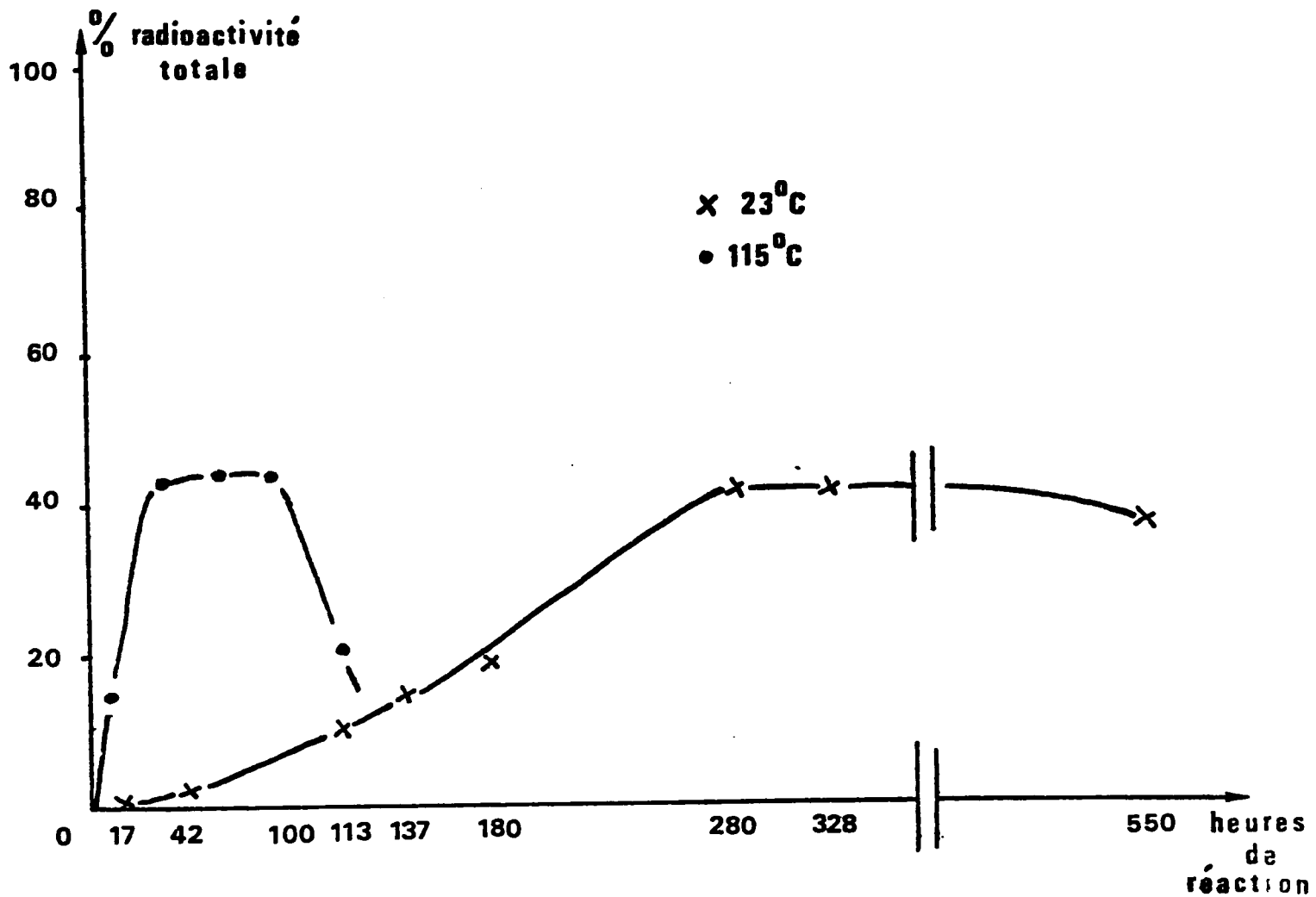
Un acide carboxylique réagit sur le carbonyl-diimidazole pour donner un acyl-imidazole qui, réagissant sur un alcool, en permet l'estérification selon le schéma ci-dessous / 63 / :



L'application de cette méthode à l'estérification du bromo-3 sn-glycérol permet d'obtenir le dérivé dipalmitoylé avec un rendement actif voisin de 40 %.

La cinétique de la réaction d'acylation a été suivie par l'enregistrement des chromatographies sur couche mince du mélange réactionnel.

A température ambiante la réaction est assez longue. Le temps d'acylation peut être sérieusement raccourci si l'on effectue la réaction au reflux de la pyridine.



Si l'on poursuit dans les conditions de reflux la réaction au-delà de 100 heures, on note une dégradation du diester formé.

c) Acylation par les chlorures d'acides gras marqués

Les chlorures d'acides gras sont préparés par action du chlorure de thionyle ou d'oxalyle sur l'acide dans le benzène.

Etant données les très faibles quantités mises en jeu, aucune purification par distillation ne peut être faite sur le chlorure d'acide marqué.

L'estérification est effectuée dans la pyridine, à température ambiante. Au bout de 2 jours les rendements en ester sont supérieurs à 70 % par rapport à l'acide.

C'est cette méthode que nous avons retenue pour l'acylation des dérivés du glycérol, vu les rendements et les conditions de réaction faciles à adapter aux synthèses actives.

3 - Différentes possibilités de former la liaison ester-phosphorique

La liaison ester-phosphorique est ensuite créée par réaction de la diacyl-1,2 halogénohydrine du sn-glycérol sur les sels d'argent d'acides phosphoriques substitués / 31 /.

La suite de la synthèse peut être effectuée de trois façons :

a) Dans le premier cas (Schéma 7)

La réaction du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol (X) avec le sel d'argent de l'ester (XI) dibenzyle de l'acide phosphorique / 39 / (Schéma 6) conduit au diester benzylique de l'acide phosphorique correspondant / 41 / (XII). Ce composé, après monodébenzylation anionique / 39 - 40 / par l'iodure de sodium, est transformé en sel de sodium puis en sel d'argent du mono-ester benzylique de l'acide phosphatidique / 42 / (XIII bis).

Ce dernier produit (XIII bis) réagit / 42 / sur le dérivé iodo-N-trityl-éthylamine pour former la phosphatidyl-éthanolamine (P.E.) biprotégée (XIV).

Le groupe benzyle est ensuite enlevé comme précédemment par reflux dans l'acétone anhydre en présence d'iodure de sodium / 42 /.

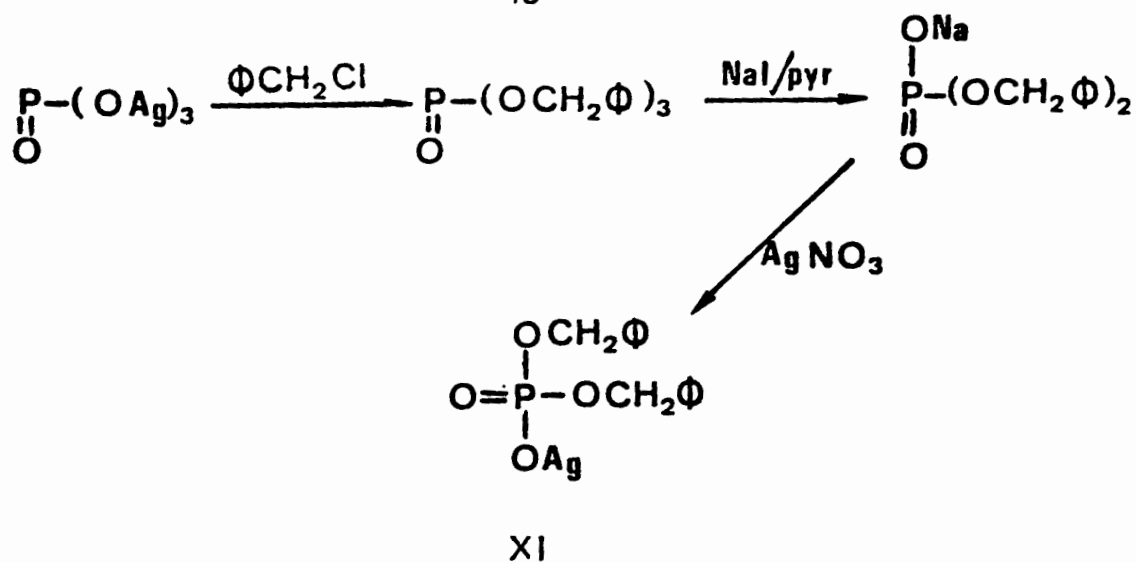


Schéma 6 - Préparation du sel d'argent de l'ester dibenzyle de l'acide phosphorique.

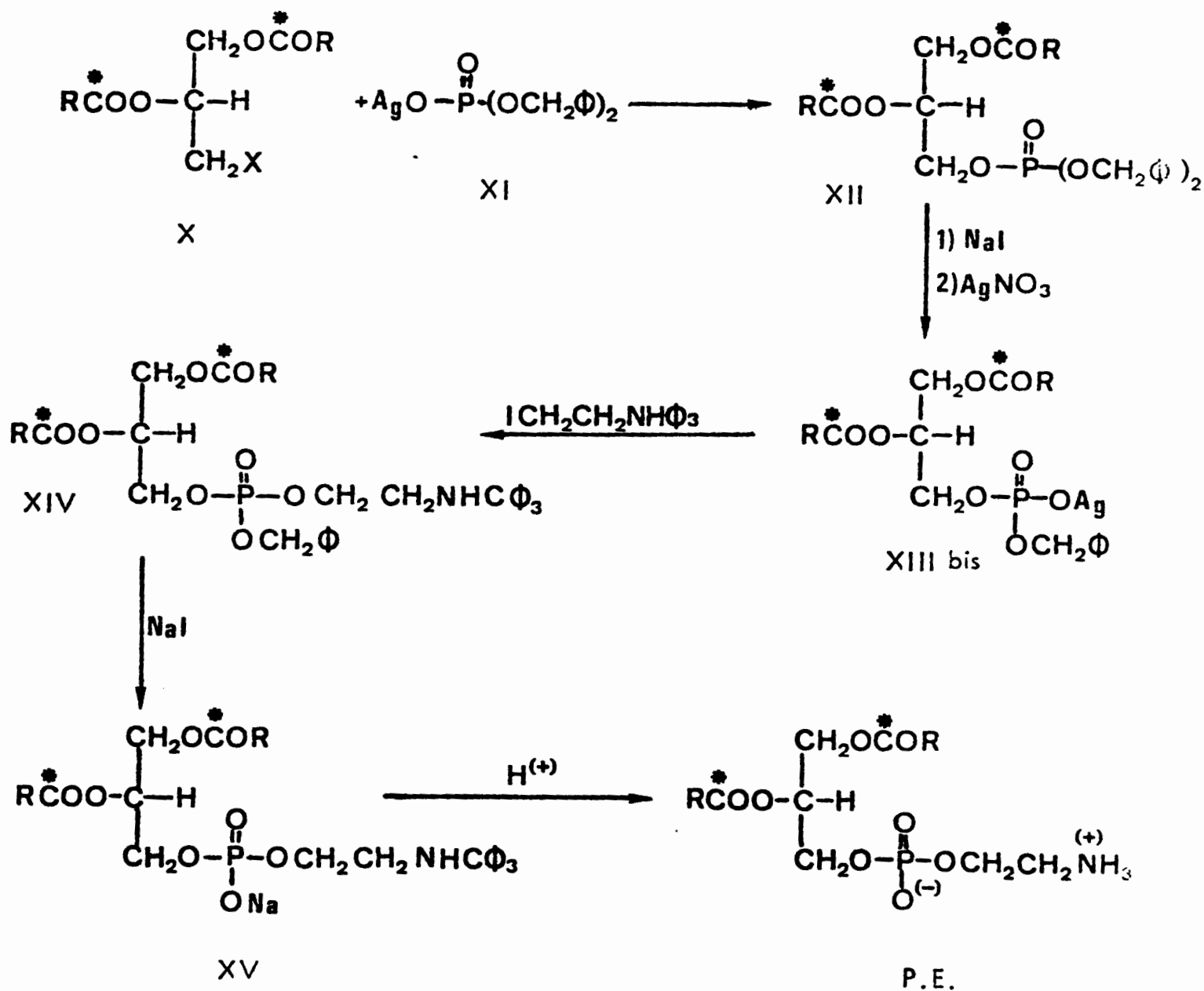


Schéma 7 - Préparation de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14.

Le groupe trityle est enlevé par hydrolyse acide (acide acétique / eau : 9 / 1).

Nous avons ainsi préparé la dipalmitoyl sn-PE (2 mCi/mMole) mais un des gros avantages de cette méthode est qu'elle permet la préparation de dérivés insaturés, aucune étape ne faisant intervenir d'hydrogénation.

Ce type de synthèse a été utilisée par de nombreux auteurs pour préparer plusieurs acides phosphatidiques (P.A.) / 31 - 36 - 43 à 46 /, céphaline (P.E.) / 34 - 47 à 49 - 42 /, N-méthyl-céphalines / 42 /, N-N'-diméthyl-céphalines / 50 /, et lécithines / 33 - 34 - 51 - 52 /.

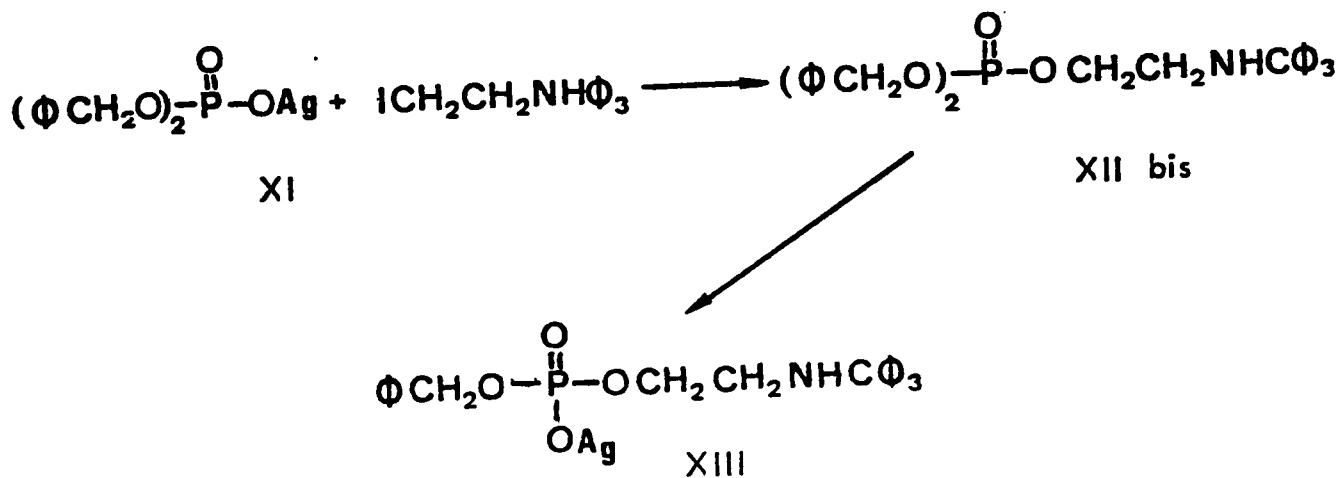
b) Dans le deuxième cas (Schéma 9)

Les molécules de P.E. protégées sont produites en condensant (Schéma 9) le diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol (X) avec le sel d'argent d'un acide phosphorique substitué (XIII) dans lequel la liaison ester-phosphorique a déjà été faite avec le dérivé iodo-trityléthylamine / 42 / (Schéma 8).

Les différences de principe avec le premier cas sont faibles.

Nous avons eu cependant de nombreux problèmes pratiques à résoudre (choix du solvant, éventuel catalyseur, ...) pour trouver les meilleures conditions de condensation du sel d'argent sur le dérivé diacyl-halogène du glycérol.

Nous avons, par cette méthode, réalisé la synthèse totale de dipalmitoyl sn-P.E. 1 mCi/mMole, dioléyl sn-P.E. 1 mCi/mMole, et montré qu'elle était adaptable à la synthèse de dérivés mixtes marqués après avoir synthétisé le palmitoyl-1 oléyl-2 bromo-3 glycérol (0,8 mCi/mMole) (Schéma 10) par une méthode d'acylation "pas à pas" / 34 /.



Sci Schéma 8 : Préparation du sel d'argent du diester benzylque et N-tritylaminoéthylque de l'acide phosphatidique

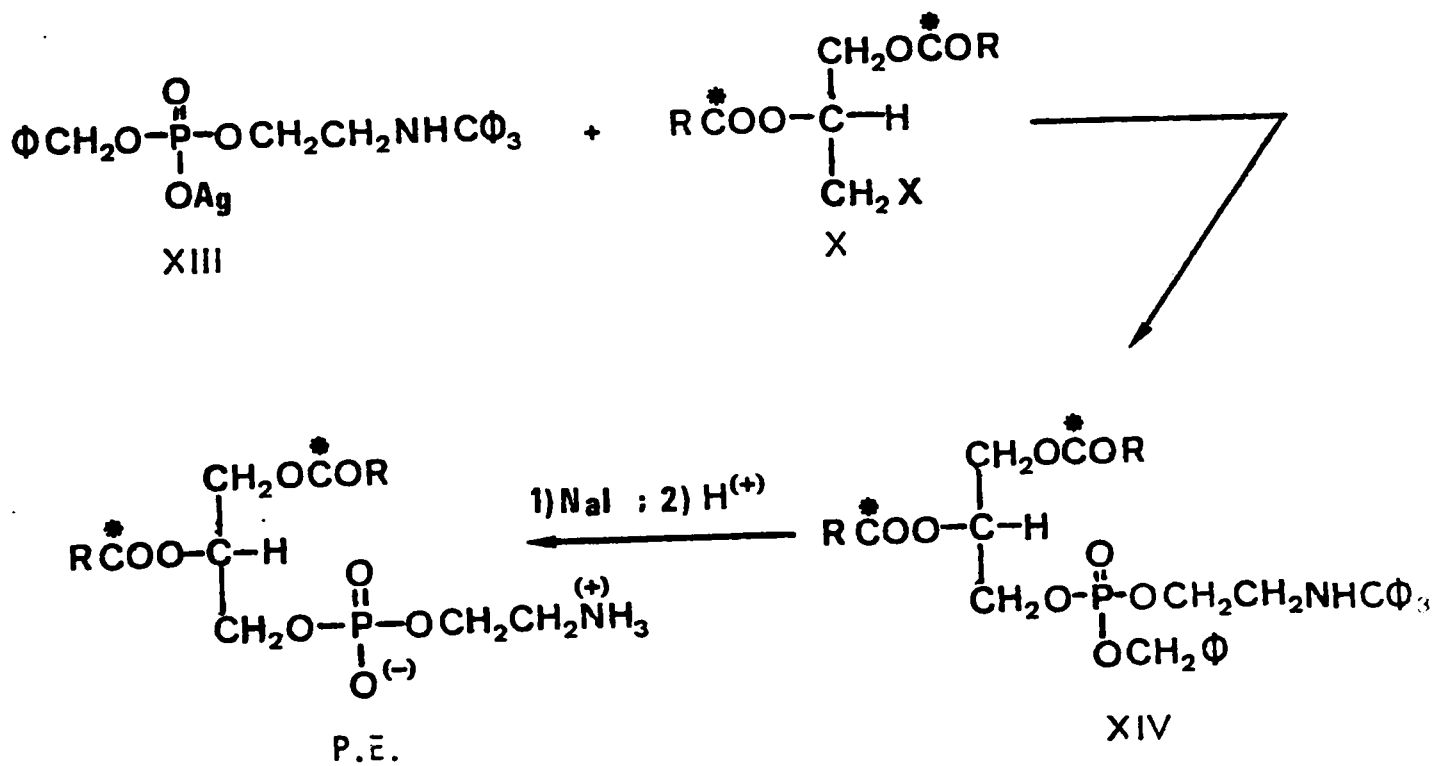
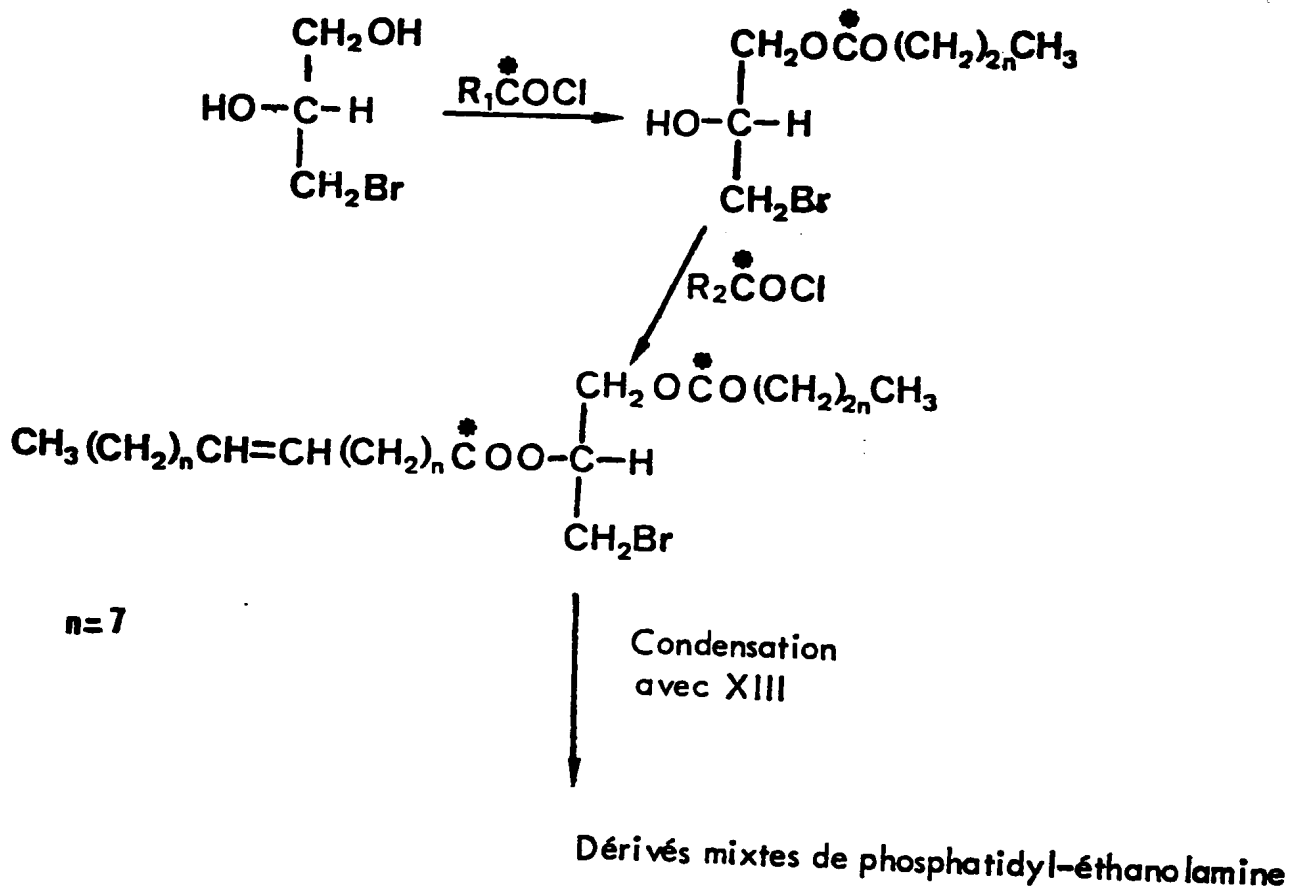


Schéma 9 - Préparation de phosphatidyl éthanolamine marquée au carbone 14.



Sch\u00e9ma 10 - Pr\u00e9paration de d\u00e9riv\u00e9s mixtes : palmitoyl-1 ol\u00e9yl-2 phosphatidyl-\u00e9thanolamine.

De même la synthèse de dérivés D, L de lyso P.E. (1 mCi/mMole) a été effectuée / 42 / (Schéma 11) à partir de trityl-1 palmitoyl-2 bromo-3 D, L-glycérol (XV).

A partir du dérivé trityl-1 palmitoyl-2 O-benzyl et N-trityl D, L-phosphatidyl éthanolamine (XVI) une débenzylation anionique par l'iodure de sodium suivie d'un traitement acide conduit à la palmitoyl-1 lyso D, L-phosphatidyl-éthanolamine par migration intra-moléculaire de l'acide palmitique de la position sn-2 à la position sn-1 lors du traitement acide.

Cette migration totale dans ces conditions acides de la position 2 à 1 avait été montrée par J. B. BILLIMORIA et K. O. LEWIS / 42 / en utilisant la méthode enzymatique de SLOTBOOM et coll. / 53 / pour déterminer la position d'acylation.

Cette méthode est basée sur le fait que la phospholipase A du venin de serpent (*Crotalus Acamanteus* ou *Vipera Russellii*) hydrolyse spécifiquement l'acide gras de l'acyl-2 lysophosphatidyl-éthanolamine avec formation de phosphoryl-éthanolamine.

La synthèse totale par cette méthode du dérivé lyso de configuration "sn" ne présente pas de grand intérêt car il est très facile, par traitement avec la phospholipase A₂ d'obtenir ce produit par voie biochimique ; par contre, c'est la seule méthode envisageable pour la synthèse de dérivés D, L qui peuvent présenter un intérêt dans certains types de recherche, le dérivé D n'existant pas à l'état naturel.

REMARQUE

Il serait possible, toujours à partir du dérivé XVI, par déprotection simultanée des groupes benzyles et trityles (hydrogénation catalytique) dans des conditions neutres, de préparer le dérivé palmitoyl-2 lyso-phosphatidyl-éthanolamine / 42 / beaucoup plus difficile à préparer par voie biologique, la phospholipase A₁ étant très souvent contaminée par une phospholipase A₂.

Dans ce cas particulier seuls les dérivés possédant des acides gras saturés pourraient être synthétisés par cette voie.

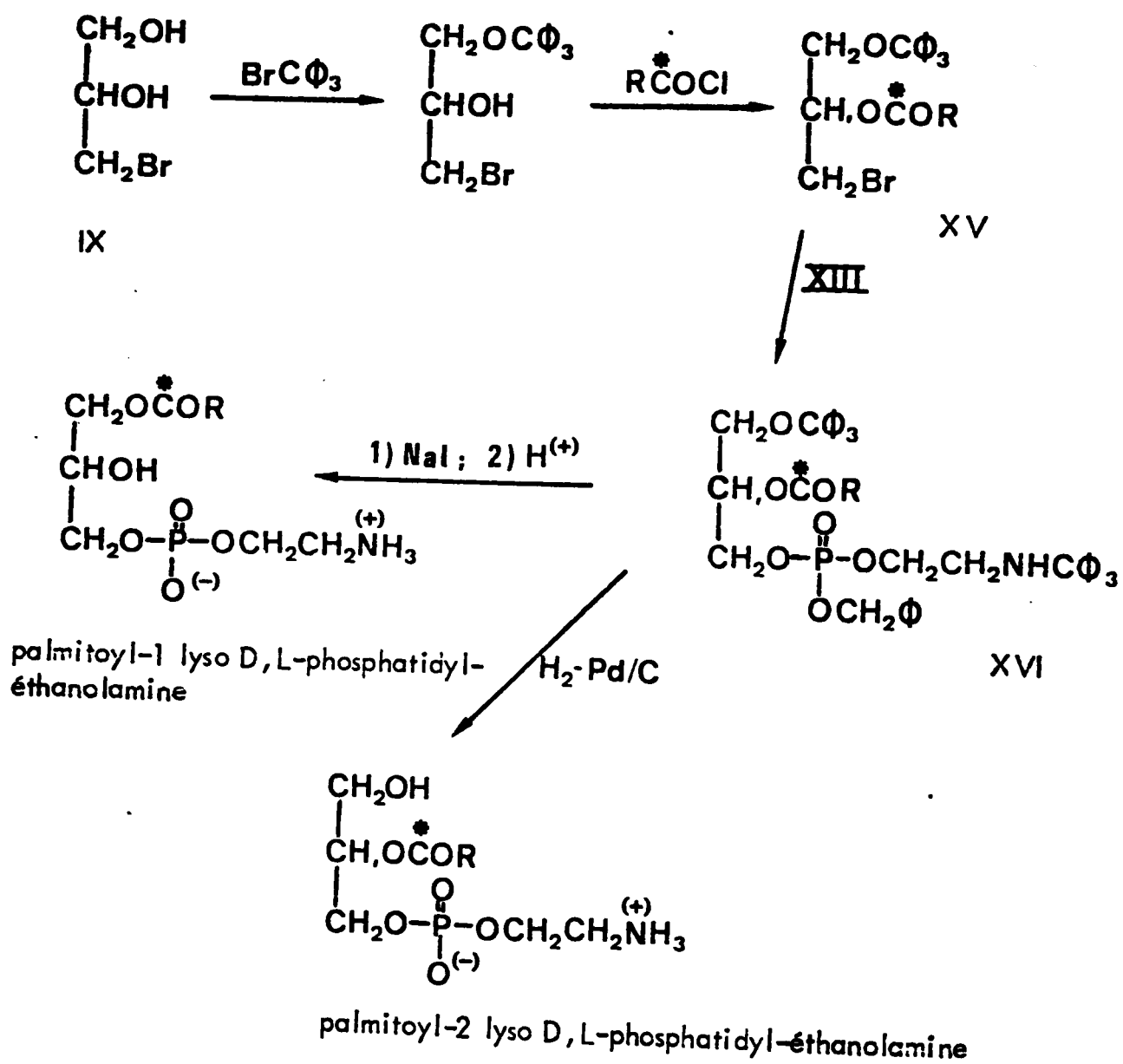


Schéma 11 - Synthèse de lyso D, L-phosphatidyl éthanolamine marquée au carbone 14.

Le type de schéma de synthèse n° 9 a été souvent utilisé par de nombreux auteurs pour préparer des céphalines / 35 - 33 - 41 - 54 à 58 / et phosphatidyl sérine / 32 - 59 / et surtout pour obtenir des phosphatides hautement insaturés / 54 à 58 /.

4 - Synthèses de différentes classes de glycérophospholipides à partir d'acide phosphatidique

Les acides phosphatidiques protégés peuvent être préparés par condensation du bromo-3 sn-glycérol sur le sel d'argent d'un diester-phosphorique, soit l'ester-dibenzylique, soit l'ester di-terbutylique / 65 - 66 /, suivie de la déprotection appropriée. (schéma 13).

L'utilisation du sel d'argent du diester benzylique de l'acide phosphorique / 31 /, méthode que nous avons employée, est limitée, par suite de la débenzylation effectuée par hydrogénolyse, à la préparation de dérivés saturés.

Par contre, l'utilisation du di-*t*.butyl-phosphate d'argent dont la préparation est décrite Schéma 12, permettrait la préparation de dérivés insaturés, puisque la déprotection s'effectue par hydrolyse acide.

L'inconvénient d'appliquer cette méthode à la synthèse de produits marqués est l'instabilité de l'acide phosphatidique di-terbutylé / 65 /. Ce dérivé ne peut, en effet, pas être purifié et doit être directement hydrolysé en acide phosphatidique, lui aussi très difficile à isoler.

Pour réaliser la synthèse des différentes classes de phospholipides à partir de l'acide phosphatidique, il faut condenser sur une des fonctions acides phosphoriques,

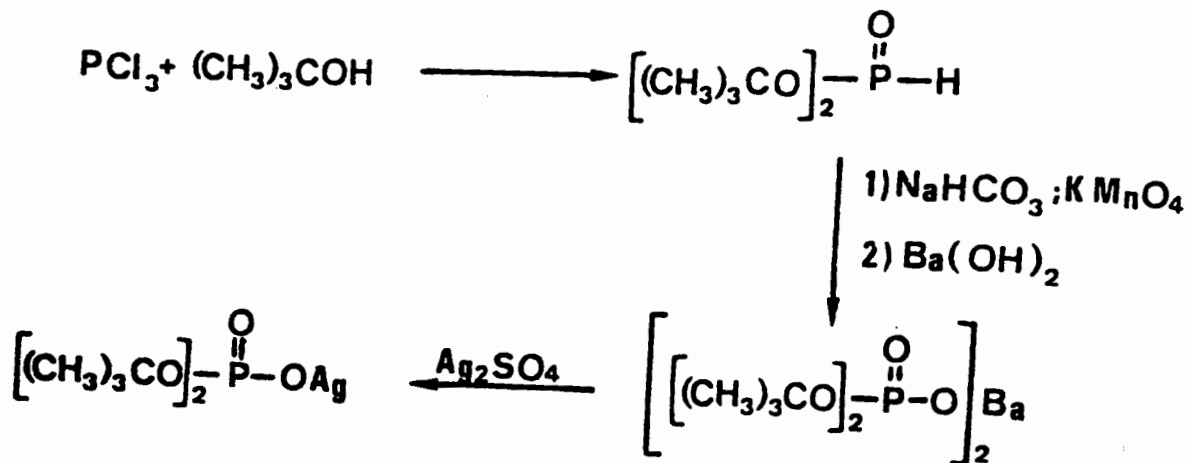


Schéma 12 - Synthèse du sel d'argent du diester tertiobutylique de l'acide phosphorique.

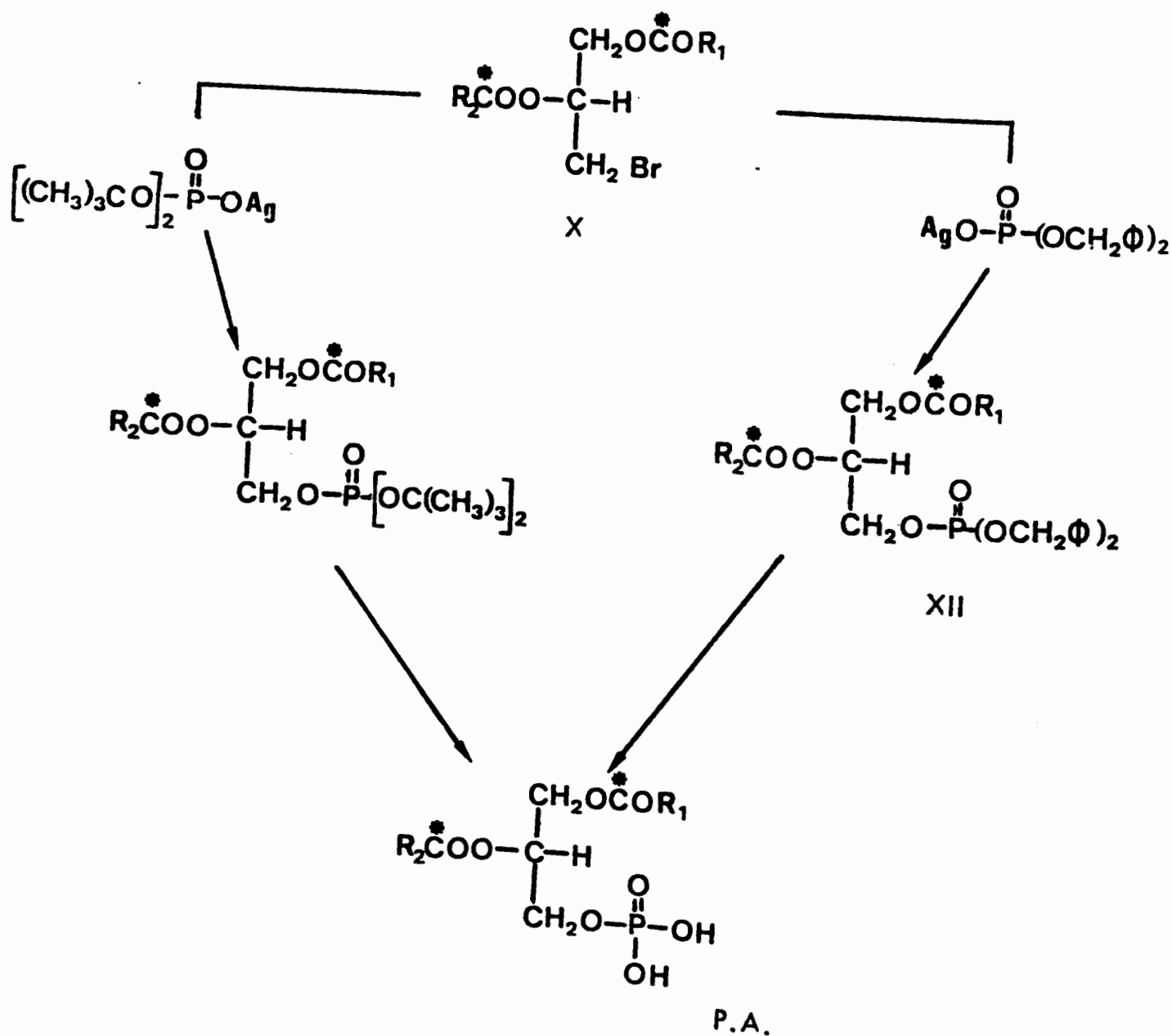


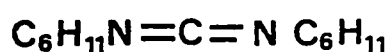
Schéma 13 - Préparation d'acide phosphatidique marqué au carbone 14.

la fonction hydroxyle d'hydroxyamines ou d'acides aminés convenablement protégés. Cette condensation se fait après activation de l'acide phosphatidique par un des catalyseurs de phosphorylation.

a) Choix de la méthode de phosphorylation

Durant les dernières années, un grand nombre de réactifs ont été proposés pour l'activation des acides carboxyliques et phosphoriques en vue de leur estérification.

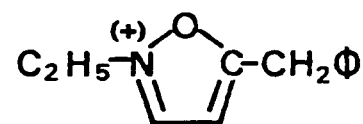
Les réactifs proposés comprennent : la dicyclohexyl-carbodiimide (a) / 106 / (D.C.C.), l'étoxyacétylène (b) / 95 à 97 / des sels d'isoxazolium substitués (c) / 98 - 99 /, le produit de réaction du phosgène sur la diméthyl-formamide (d) / 100 - 101 /, l'acide éthyl-métaphosphorique préparé par action de l'éther sur l'anhydride phosphorique / 102 - 103 /, le trichloroacétonitrile / 104 /, le carbonyl-diimidazole (e) / 105 / et différents chlorures d'acides sulfoniques aromatiques (f, g) / 106 à 108 /. Ces réactifs ont été notamment utilisés pour la synthèse de liaisons C'₃ - C'₅ inter-nucléotides / 109 /.



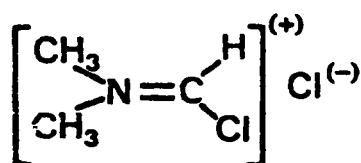
a



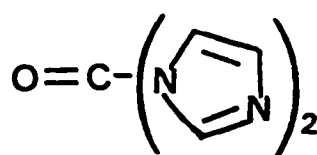
b



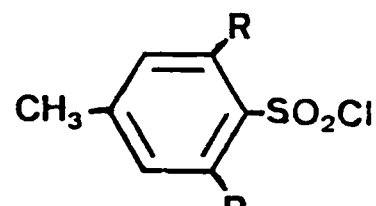
c



d

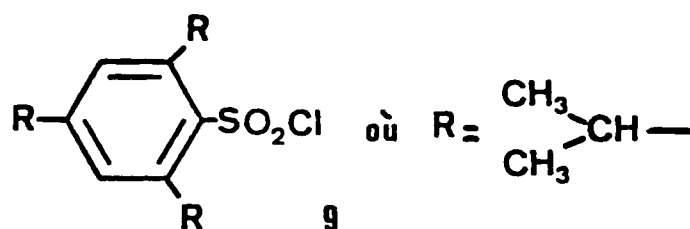


e



f

où R = H ou CH₃

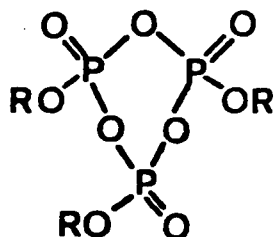


g

Les résultats rapportés indiquent que dans la plupart des cas, la D.C.C. et les dérivés de chlorure d'acide aryl-sulfonique sont les plus efficaces activateurs.

Il a été montré dans le cas de la D.C.C. / 110 / et du trichloracétonitrile / 111 / que la réaction sur un mono-ester phosphorique conduit rapidement à

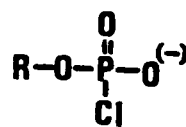
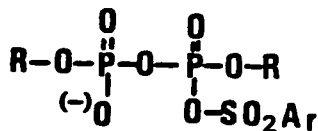
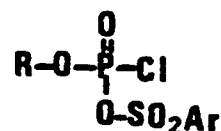
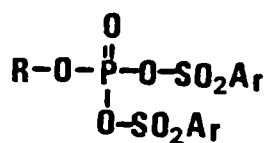
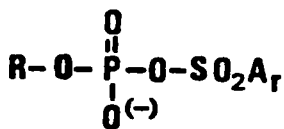
la formation d'un trimétaphosphate et que ce dernier composé est probablement l'entité phosphorylante initiale.



Dans le cas des dérivés de chlorure d'aryl-sulfoniques, l'utilisation d'un équivalent molaire donne, semble-t-il, le trimétaphosphate qui, durant le traitement pyridine/eau, se coupe pour former en quantité équimoléculaire le mono-ester de départ et le pyrophosphate correspondant.

Lorsque, par contre, on utilise 2 à 2,5 équivalents molaires du chlorure d'acide aryl-sulfonique, le traitement aqueux suivant régénère principalement le mono-ester, la formation de dérivé pyrophosphate étant réduite.

Les entités formées en présence d'excès de chlorure d'aryl-sulfonique pourraient avoir les formules suivantes. Elles seraient extrêmement réactives et régénèreraient le mono-ester si elles étaient hydrolysées.



Il ne semble actuellement pas possible de préférer l'une ou l'autre des formules proposées.

b) Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine, choline et sérine marquées

Dans le cas de la synthèse de phospholipides les catalyseurs de phosphorylation les plus couramment utilisés sont le trichloroacétonitrile / 67 / et la dicyclohexylcarbodiimide / 68 /.

Récemment ANEJA et ses collaborateurs ont introduit, dans ce domaine, l'usage du chlorure de l'acide triisopropyl-benzène-sulfonique (T.P.S.) / 69 /.

C'est cette méthode que nous avons choisie d'utiliser pour nos synthèses; les rendements sont en effet acceptables et la formation de produits dérivés (notamment des pyrophosphates) est moindre.

Nous avons réalisé la synthèse de P.E., P.C., P.S. marquées par cette méthode (Schéma 15). Les dérivés hydroxylés suivants ont été utilisés :

- la N-trityléthanolamine / 70 / préparée par action du bromure de trityle sur l'éthanolamine en présence de pyridine.
- l'acétate de choline / 72 / préparé à partir de choline (elle-même obtenue par filtration de chlorure de choline sur une colonne échangeuse d'ions forme OH ou sur carbonate d'argent). Il est absolument nécessaire d'employer un sel de choline, car la basicité du groupe ammonium quaternaire de la choline base est trop forte.
- l'ester t.butylique de la N.t.butoxycarbonyl-L-sérine préparé suivant le Schéma 14 / 59 /. L'estérification de la t.boc.O.benzyl L-sérine est effectuée par l'isobutylène. La fonction hydroxyle est ensuite régénérée par hydrogénolyse.

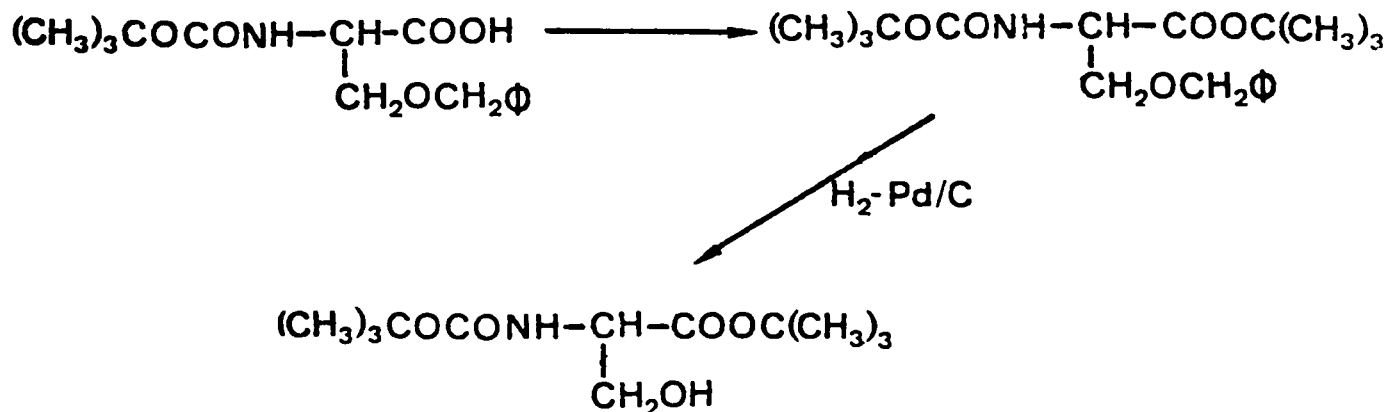


Schéma 14 - Synthèse de l'ester tertibutylique de la N-terbutyloxycarbonyl L-sérine.

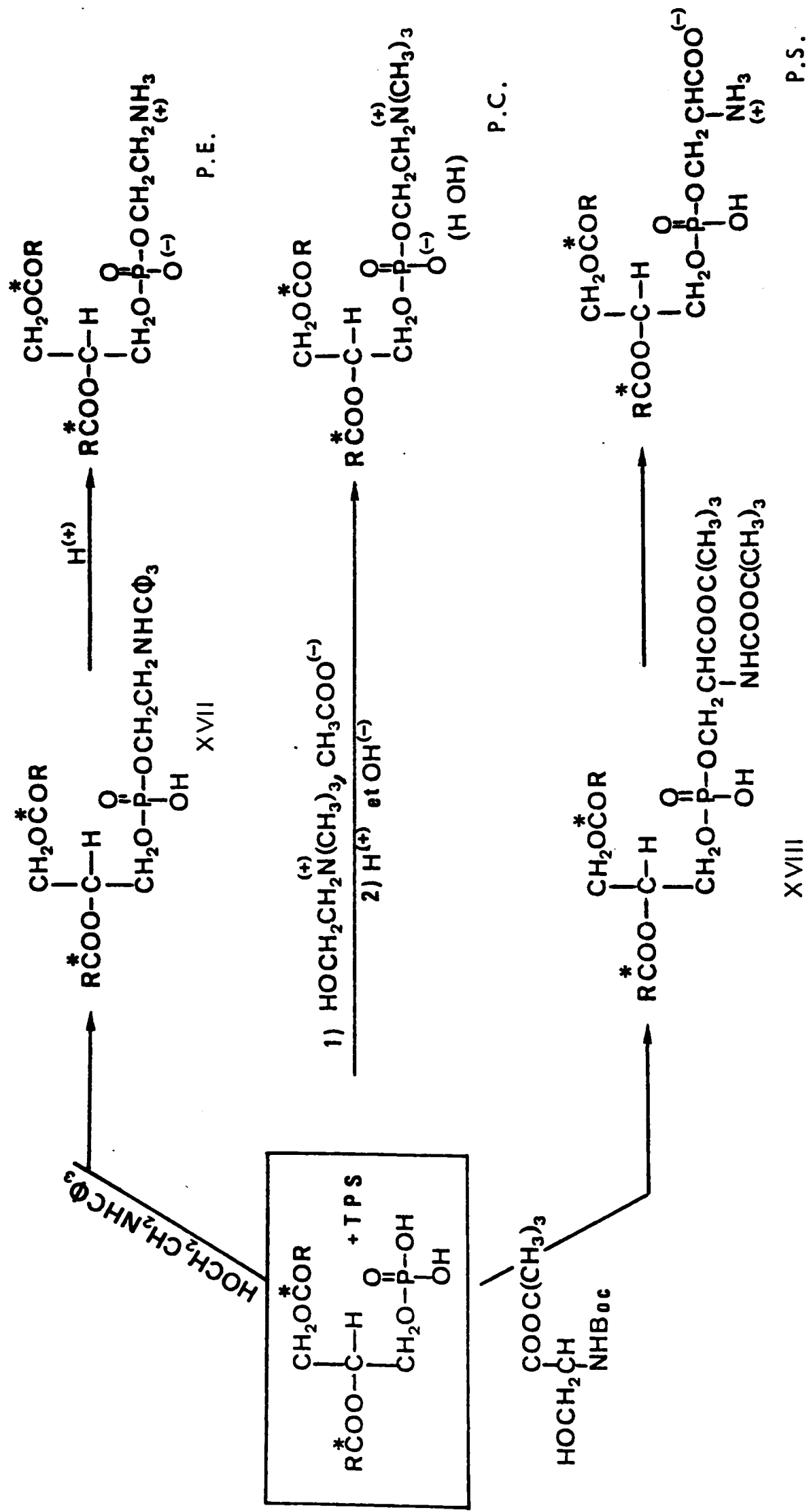


Schéma 15 - Préparation à partir d'acide phosphatidique de phosphatidyl-éthanolamine, choline et sérine marquées au carbone 14.

II - Synthèses de phosphatidyl-éthanolamine et phosphatidyl-choline marquées à partir de dérivés glycérophosphoryl-éthanolamine ou choline

Une autre possibilité de réaliser la synthèse de phospholipides est de construire d'abord le squelette glycérophosphoryl-éthanolamine ou choline puis estérifier les deux positions libres du glycérol.

Cette voie peut sembler intéressante pour la préparation de molécules marquées.

Il n'y a en effet que très peu d'étapes actives.

Cependant il faut garder à l'esprit que l'estérification de glycérophosphoryl-choline ou éthanolamine protégée se fait avec beaucoup de difficultés et conduit principalement aux dérivés lyso / 73 à 75 /.

1 - A partir de glycéro-phosphoryl-choline (schéma 16)

Ces dernières années ont été mises au point des méthodes qui permettent l'estérification des esters glycéro-phosphoriques des bases aminées / 52 - 75 à 86 /. Le point de départ de ces synthèses, dans le cas des léciithines, est le complexe de cadmium de deux molécules de sn-glycérophosphoryl-choline pour trois molécules de chlorure de cadmium / 52 - 75 - 77 à 84 / obtenu soit par synthèse chimique, soit par déacylation de P.C. naturelle (Schéma 16).

Les essais préliminaires que nous avons effectués en suivant ce schéma, ne nous ayant pas donné satisfaction, ce mode de synthèse n'a pas été poursuivi.

2 - A partir de glycérophosphoryl-éthanolamine N-phtaloylée ou N-tritylée

Dans le cas des céphalines / 37 - 87 à 90 / le sel de baryum du glycérophosphodiester N-phtaloylaminoéthyle, que nous avons préparé au laboratoire (Schéma 17) est estérifié pour conduire à la phosphatidyl-éthanolamine N-protégée par le groupement phtalyle ensuite enlevé par hydrazinolyse (Schéma 17).

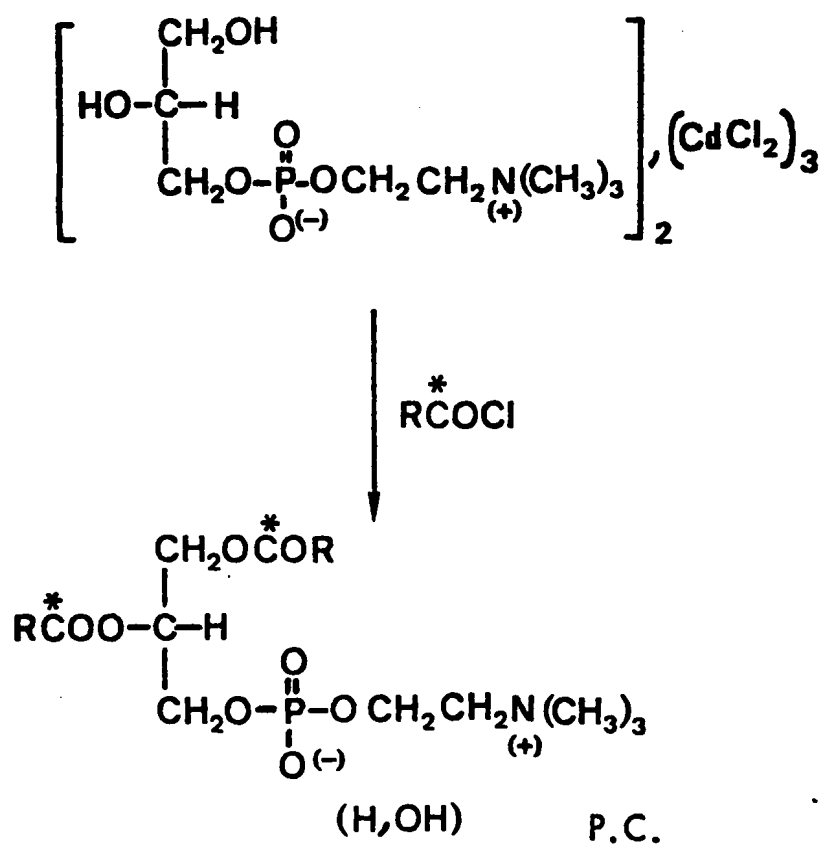


Schéma 16 - Synthèse de phosphatidyl-choline marquée au carbone 14 à partir du complexe de chlorure de cadmium et de glycérophosphoryl-choline.

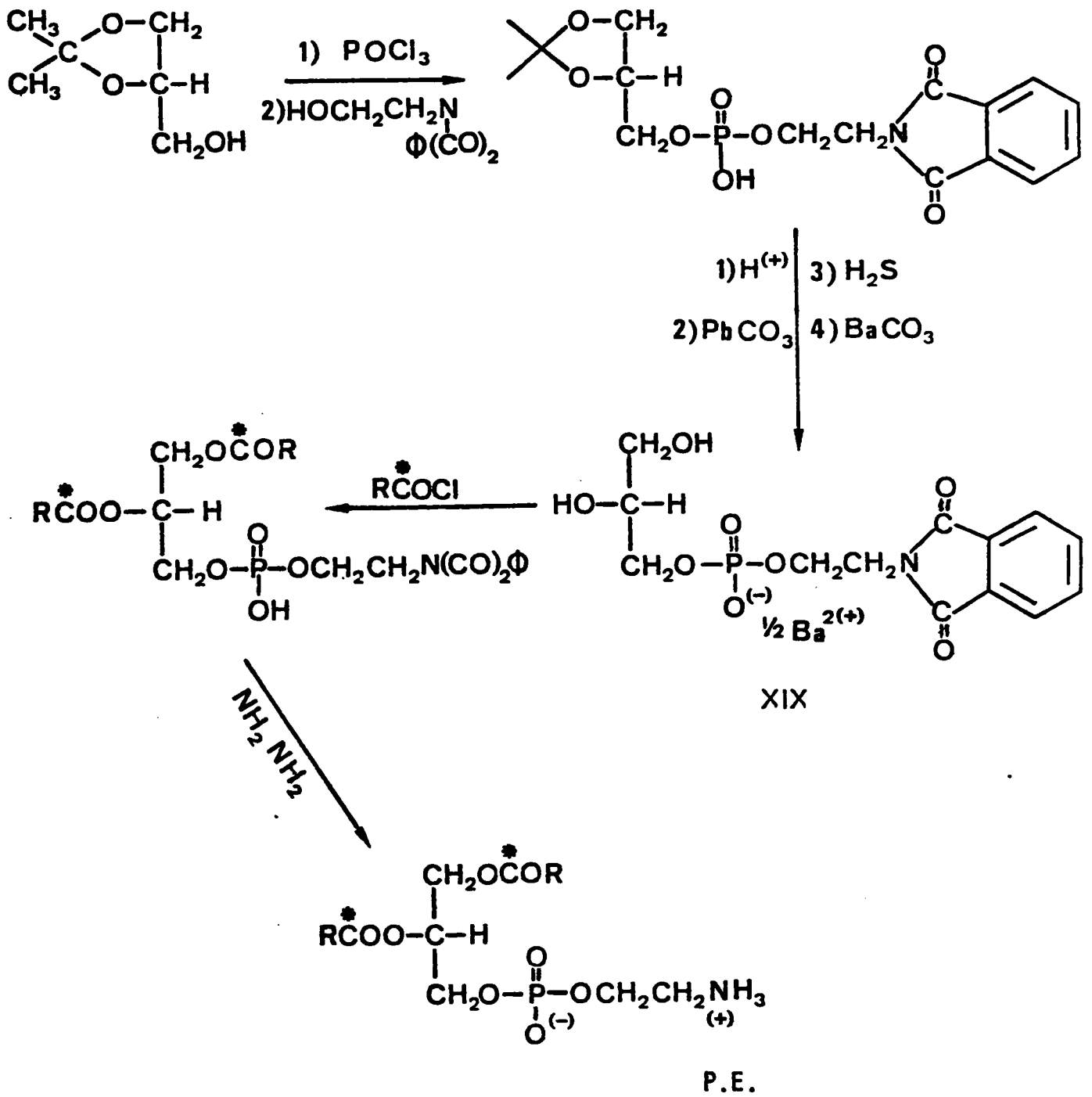


Schéma 17 - Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 à partir de glycérophosphoryl-éthanolamine N-phthaloylée.

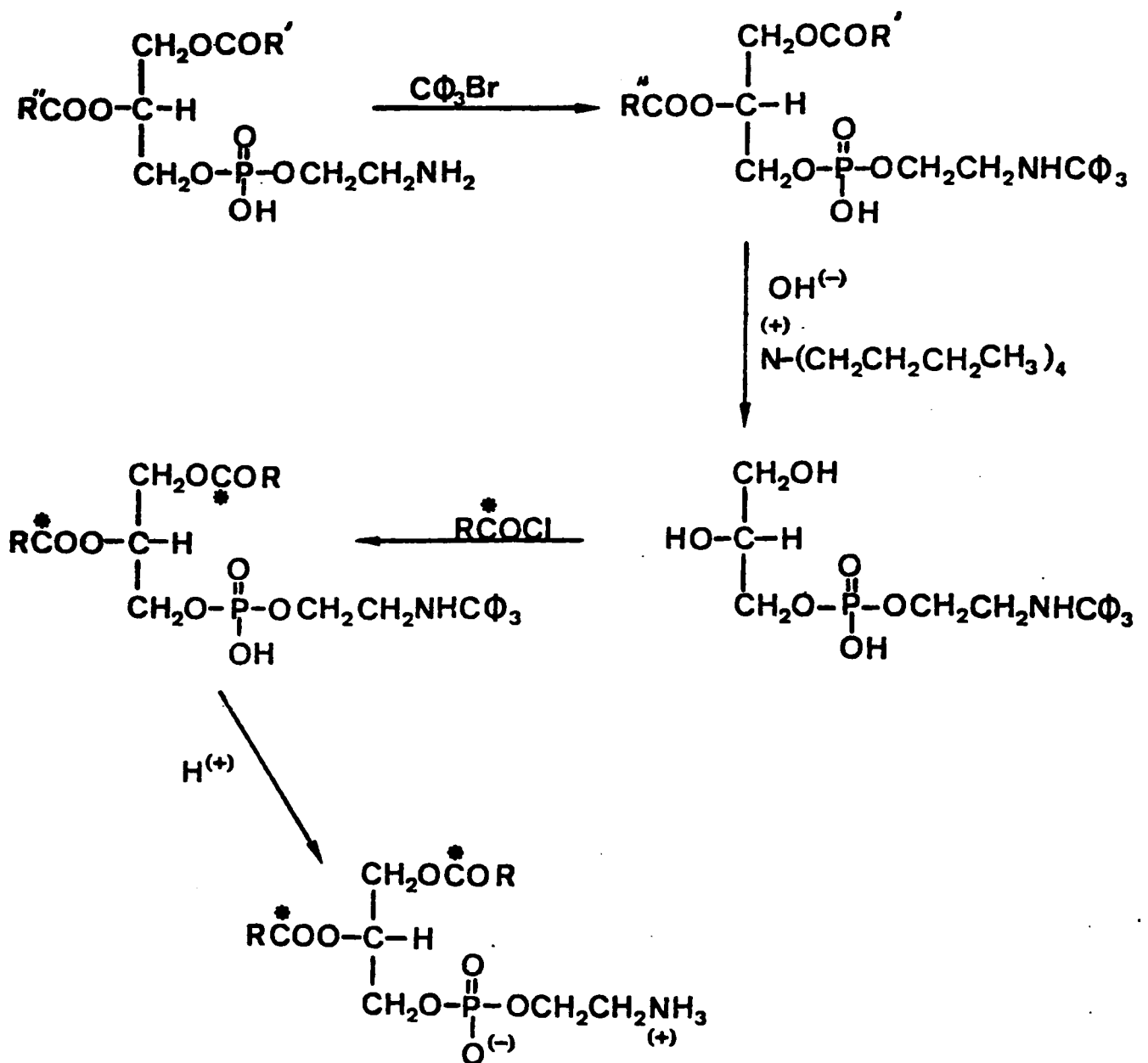


Schéma 18 - Synthèse de phosphatidyl-éthanolamine marquée au carbone 14 par acylation de glycérophosphoryl-éthanolamine N-tritylée.

L'estérification que nous avons effectuée sur XIX conduit après hydrazinolyse à un rendement de 7 % en P.E. marquée, au sein d'un mélange réactionnel contenant un grand nombre d'impuretés actives ou inactives.

Ce rendement de 7 % par rapport à l'acide marqué, déterminé par l'enregistrement des C.C.M., est tout à fait comparable à ceux obtenus dans la littérature (10 %). Il est faible et confirme la difficulté de préparer des céphalines marquées par cette méthode.

En nous inspirant des publications / 91 - 92 /, nous avons de même essayé d'estérifier la phosphoryl-éthanolamine N-tritylée préparée par déacylation de phosphatidyl-éthanolamine N-tritylée (Schéma 18). Cette déacylation est effectuée par méthanolyse / 93 / en présence de tétrabutylamine.

Les résultats obtenus lors de la réacylation par le chlorure d'acide actif ne sont pas satisfaisants du point de vue rendement radioactif. Nous avons donc abandonné l'utilisation de cette méthode.

III - Conclusions

La méthode d'estérification des dérivés du glycérol que nous avons retenue est celle utilisant le chlorure d'acide.

Pour la synthèse de phosphatidyl-éthanolamine ^{14}C , le Schéma 7 doit être rejeté ; le rendement actif en P.E. par rapport à l'acide palmitique de 20 % est inférieur à celui des synthèses effectuées selon les Schémas 9 et 15. De plus, le protocole expérimental ne présente aucun avantage particulier.

De même, l'acylation de dérivés de glycérophosphoryl-choline ou glycérophosphoryl-éthanolamine ne peut convenir pour des synthèses actives, les rendements étant trop faibles.

Nous préférons donc utiliser pour les synthèses actives (P.E., P.C., P.S.), le Schéma 15 pour des composés saturés, tandis que le Schéma 9 sera suivi pour obtenir des phosphatidyl-éthanolamines insaturées. Les rendements en P.E. obtenus par l'une ou l'autre de ces méthodes sont de l'ordre de 30 % par rapport à l'acide palmitique.

B - Modes opératoires

I - Préparation de glycérophosphatides à partir du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol

A) Diacyl-1,2 bromo (ou iodo)-3 sn-glycérol (X)
.....

1 - Bromo-3 et iodo-3 sn-glycérol

La synthèse du dérivé bromé a été effectuée en suivant le mode opératoire décrit dans les références / 38 et 36 /, celle du dérivé iodé suivant / 37 / avec les rendements et les caractéristiques indiqués (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, ..).

Les deux dérivés présentent des spectres de R.M.N. tout à fait similaires.

- R.M.N. ($\text{CD}_3\text{COCD}_3 + \text{D}_2\text{O}$) dérivé bromé

multiplet	2 H	3,2 ppm	2 H du C_3
multiplet	1 H	3,5 ppm	H du C_2
multiplet	2 H	3,75 ppm	2 H du C_1

- S.M. (dérivé bromé)

Les doublets sont dus aux isotopes 79-81 du brome en proportion 1/1.

m/e : 154 - 156, (traces), M^+ ; m/e : 136 - 138, (traces), $(\text{M}-\text{OH}_2)^+$; m/e : 122 - 124 , 50 %, $(\text{M}-\text{CH}_2\text{OH})^+$; m/e : 92 - 94 , 10 % ; m/e : 79 - 81 , 11 % ; m/e : 78 - 80 , 9 % ; m/e : 60 , 74 % $(\text{CH}_2\text{OHCHO})^+$; m/e : 44 , 83 % ; m/e : 43 , 100 % (CH_3CO^+) ; m/e 42 , 100 %.

- S.M. (dérivé iodé)

m/e 202 , 28 % (M^+) ; m/e 171 , 75 % ($M-CH_2OH^+$) ; m/e 75 , 100 % ($M-I^+$) ;
m/e 57 , 43 % ; m/e 45 , 75 % ; m/e 44 , 60 % ; m/e 43 , 63 % (CH_3CO^+) ;
m/e 31 , 59 % (CH_2OH^+).

2 - Méthodes d'estérification

Les descriptions de ces méthodes sont données pour la synthèse de la dipalmitoyl-bromohydrine. Les conditions opératoires restent valables quel que soit l'acide ou l'alcool que nous avons été amenés à utiliser.

a) Estérification à l'aide de T.P.S.

En boîte à gants, dans 5 ml de pyridine anhydre, 565 mg (2,2 mMoles) d'acide palmitique (^{14}C)-1 et 667 mg (2,2 mMoles) de T.P.S. sont mis à réagir sous agitation magnétique, à la température du laboratoire, pendant 2 heures.

Au bout de ce temps, rajouter 156 mg de bromo-glycérol (1 mMole, 10 % en défaut par rapport à l'acide) dissous dans 2 ml de pyridine anhydre.

La réaction se poursuit durant 3 jours à température ambiante. Le rendement de cette réaction est de 60 à 65 % (constant sur 5 essais).

La réaction achevée, ajouter de l'eau afin de détruire le T.P.S. qui n'a pas réagi. Ajouter de l'éther ou du chloroforme et laver à l'eau la phase organique, puis la sécher sur sulfate de sodium anhydre.

b) Estérification via l'acyl-imidazole

En boîte à gants, 500 mg (2,3 mMoles) d'acide palmitique (^{14}C)-1 sont dissous avec (2,3 mMoles), 410 mg de carbonyl-diimidazol dans 7 ml de T.H.F. anhydre.

Après 24 heures d'agitation, 170 mg (1,1 mM) de bromoglycérol (10 % en défaut par rapport à l'acide) dissous dans 2 ml de T.H.F. sont rajoutés au mélange précédent.

La formation de X a été suivie par chromatographie sur couche mince ; hexane / éther : 3/1.

Les rendements de formation atteignent 40 % au bout de 10 jours à température ambiante ou 30 heures au reflux de la pyridine.

c) Estérification par le chlorure d'acide

. Préparation du chlorure d'acide

Sous azote sec, à 2,9 g (11 mMoles, 5 mCi) d'acide palmitique dissous dans 5 ml de benzène anhydre, rajouter lentement 2,5 ml de chlorure de thionyle (environ 25 mMoles) ou de chlorure d'oxalyle, dissous dans 2 ml de benzène, la température étant maintenue par un bain de glace.

L'agitation magnétique, 2 heures à température ambiante, est suivie d'une heure et demi de reflux.

L'évaporation complète du benzène et de l'excès de chlorure de thionyle est effectuée sous 0,8 mm de mercure en évaporateur rotatif. Vu les faibles quantités il ne peut être question de distiller le chlorure d'acide comme il l'est fait pour les chlorures d'acides non marqués.

. Estérification

Sous courant d'azote sec, à 760 mg (4,5 mMoles) de bromoglycérol dissous dans 2 ml de benzène anhydre, ajouter 1,4 ml (20 mMoles) de pyridine anhydre puis, la température ayant été abaissée par un bain de glace, ajouter à la seringue le chlorure d'acide dissous dans 5 cc de benzène.

- R.M.N.

1 multiplet	1 H	5,2 ppm	H du squelette glycérol (C ₂)
1 massif	2 H	4,3 ppm	H portés par le carbone C ₁
1 doublet	2 H	3,5 ppm	H portés par le carbone C ₃
1 massif	4 H	2,25 ppm	2 CH ₂ en α du Co
1 singulet	52 H	1,2 ppm	CH ₂ de la chaîne de l'acide palmitique
1 massif	6 H	0,8 ppm	2 CH ₃ méthyles terminaux

- S.M. dérivé iodé

m/e 678 , traces M⁺ ; m/e 553 , 23 % ; m/e 552 , 97 % (M-I + H)⁺ ; m/e 551 , 100 % (M-I)⁺ ; m/e 423 , 60 % (M-RCOO)⁺ ; m/e 377 , 32 % ; m/e 376 , 20 % ; m/e 375 , 35 % ; m/e 374 , 14 % ; m/e 297 , 38 % ; m/e 296 , 34 % ; m/e 295 , 62 % ; m/e 240 , 21 % ; m/e 239 , 92 % (CH₃(CH₂)₁₄)⁺ ; m/e 238 , 36 % ; m/e 112 , 26 % ; m/e 98 , 59 % ; m/e 85 , 16 % ; m/e 84 , 25 % ; m/e 71 , 18 % ; m/e 57 , 28 %.

- S.M. dérivé bromé

Les doublets sont dus aux isotopes 79-81 du brome.

m/e 632 et 630 , 8 % , M⁺ ; m/e 551 , 2 % (M-Br)⁺ ; m/e 395 et 393 , 17 % ; m/e 378 et 376 , 54 % (M-RCOO + H)⁺ ; m/e 377 et 375 , 25 % (M-RCOO)⁺ ; m/e 297 + 296 , 14 % ; m/e 240 , 17 % ; m/e 239 , 100 % , CH₃ (CH₂)₁₄⁺ ; m/e 238 , 38 % ; m/e 112 , 27 % ; m/e 98 , 67 % ; m/e 97 et 95 , 14 % ; m/e 85 et 83 , 21 % ; m/e 71 , 33 % ; m/e 69 , 25 % ; m/e 57 , 61 %.

- B) Synthèses de dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine 2 mCi/mMole, par condensation de iodo-trityléthylamine sur le sel d'argent de l'ester benzylique de l'acide dipalmitoyl-phosphatidique (Schéma 7)

1 - Diester benzylique de l'acide phosphatidique (XII) 2 mCi/mMole

Nous avons effectué la condensation du sel d'argent (XI) préparé selon / 39 / sur le dérivé bromé et iodé du diacyl sn-glycérol.

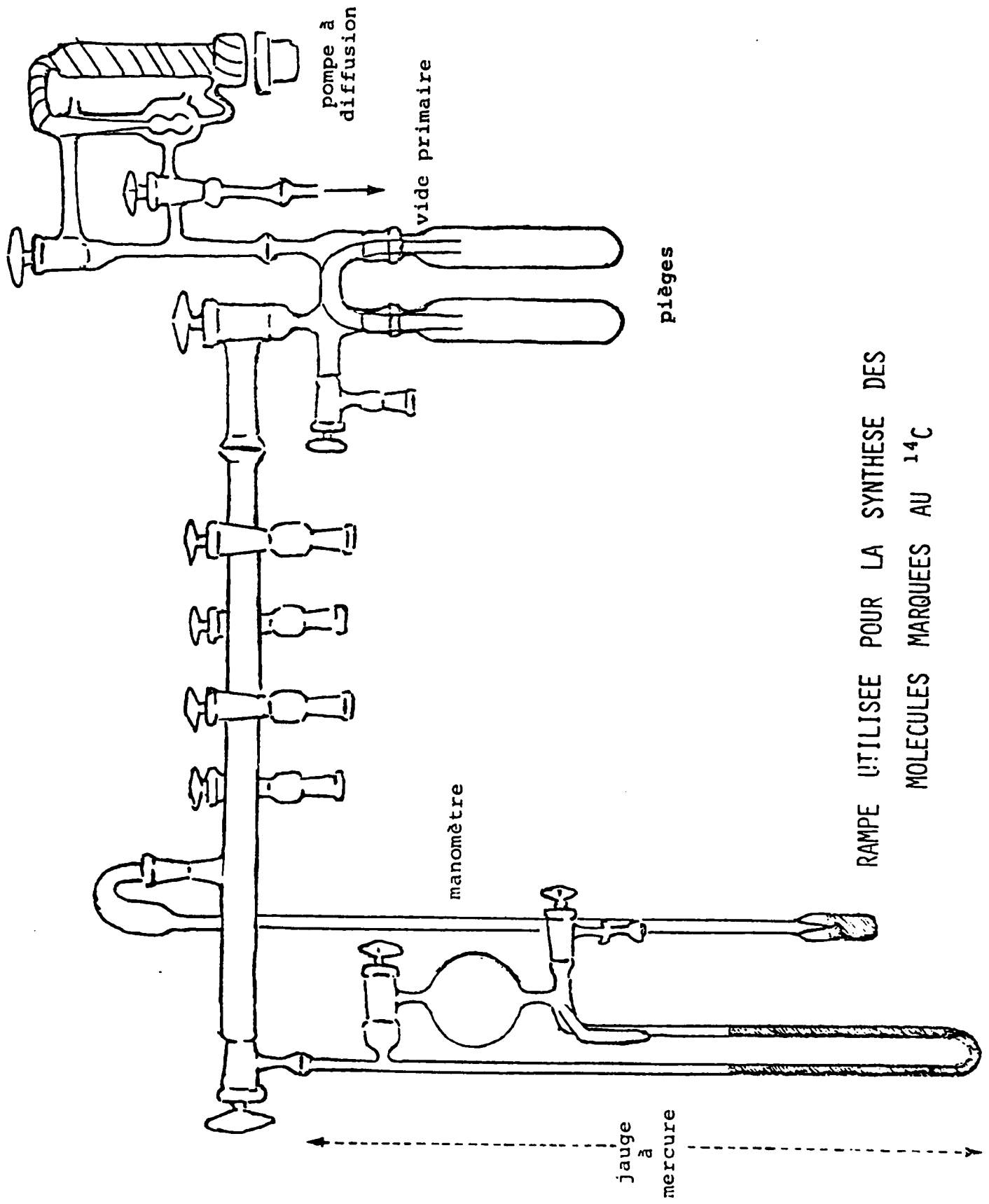
Dans la littérature cette réaction est effectuée, avec une bonne agitation, au reflux du benzène (pour le dérivé iodé) et de l'acétonitrile (pour le dérivé bromé).

Vus les très faibles volumes de solvant utilisés pour nos manipulations actives, après quelques essais infructueux de réaction au reflux dans un ballon, nous avons réalisé la condensation en ampoule scellée sous vide, dans une étuve munie d'un dispositif d'agitation efficace. Cette technique permet une bonne homogénéisation du mélange réactionnel, les sels d'argent étant insolubles dans ces solvants. De plus, cela permet d'effectuer la réaction à l'abri total de la lumière (sels d'argent instables) et de l'humidité.

Une étude systématique de solvants a été faite dans le cas du dérivé bromé. Alors que le rendement est de 50 % (6 essais) dans l'acétonitrile, l'introduction d'iodure de sodium anhydre dans le mélange réactionnel permet une amélioration du rendement dans le cas où le benzène est utilisé comme solvant (rendement 80 %).

La condensation sur le dérivé iodé s'effectue dans le benzène avec un rendement de 50 %.

Après ces divers essais, nous avons abandonné l'utilisation du dérivé iodé (beaucoup plus instable que le dérivé bromé) et avons retenu le protocole expérimental suivant :



RAMPE UTILISEE POUR LA SYNTHESE DES
MOLECULES MARQUEES AU ^{14}C

Dans une ampoule à sceller munie d'un rodage mâle n° 1, contenant 3 mMoles (1,15 g) du sel d'argent (XI) parfaitement sec et une pointe de spatule d'iodure de sodium anhydre, ajouter en boîte à gants 0,88 mMole (1,76 mCi, A.S. = 2 mCi/mMole) de dipalmitoyl-bromo-sn-glycérol dissous dans 10 ml de benzène anhydre.

L'ampoule est alors fixée sur la rampe à vide et le mélange réactionnel refroidi précautionneusement à l'azote liquide après dégazage. Le vide primaire étant effectué, l'ampoule est scellée. Après avoir laissé le mélange revenir à la température ambiante, l'ampoule est introduite dans un cylindre métallique étanche ensuite installé dans l'étuve tournante.

La réaction de condensation est effectuée à 80°C pendant 8 heures.

L'ampoule est ensuite ouverte et son contenu est filtré sur Millipore 5 μ pour extraire les sels qui n'ont pas réagi et ceux qui se sont formés (AgBr).

Une C.C.M. chloroforme / éther : 9/1, indique la présence d'un nouveau produit (RF = 0,8) visible en U.V., contenant du phosphore et dont la radioactivité représente 80 % de l'activité totale.

Aucune des nombreuses méthodes de chromatographie sur colonne ne nous ayant donné de bons résultats, la purification du dérivé XII est effectuée par chromatographie sur plaque préparative (solvant chloroforme / éther : 9/1).

Le produit attendu est localisé sous rayonnement U.V. et par autoradiographie de la plaque préparative.

Après récupération de la silice et extraction par l'éther, on recueille 525 mg, 1,38 mCi (rendement actif par rapport au dérivé bromé 78 %) d'un beau produit blanc (A.S. = 2 mCi/mMole).

Le spectre de R.M.N. permet de confirmer la structure.

1 singulet	10 H	7,3 ppm	10 H des groupes benzyles
1 doublet déformé	5 H	5 ppm	4 H des CH ₂ des groupes benzyles 1 H du squelette glycérol (C ₂)
1 multiplet	4 H	4,1 ppm	2 CH ₂ du C ₁ et C ₃ du squelette glycérol
1 multiplet	4 H	2,2 ppm	2 CH ₂ en du CO
1 singulet	52 H	1,15 ppm	Hydrogènes de la chaîne de l'acide palmitique
1 massif	6 H	0,9 ppm	2 méthyles de l'acide palmitique

Ce composé peut facilement être conservé à sec, au réfrigérateur, pendant quelques mois sans aucune décomposition.

2 - Préparation de la O-benzyl-N-trityl-dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (XIV) 2 mCi/mMole

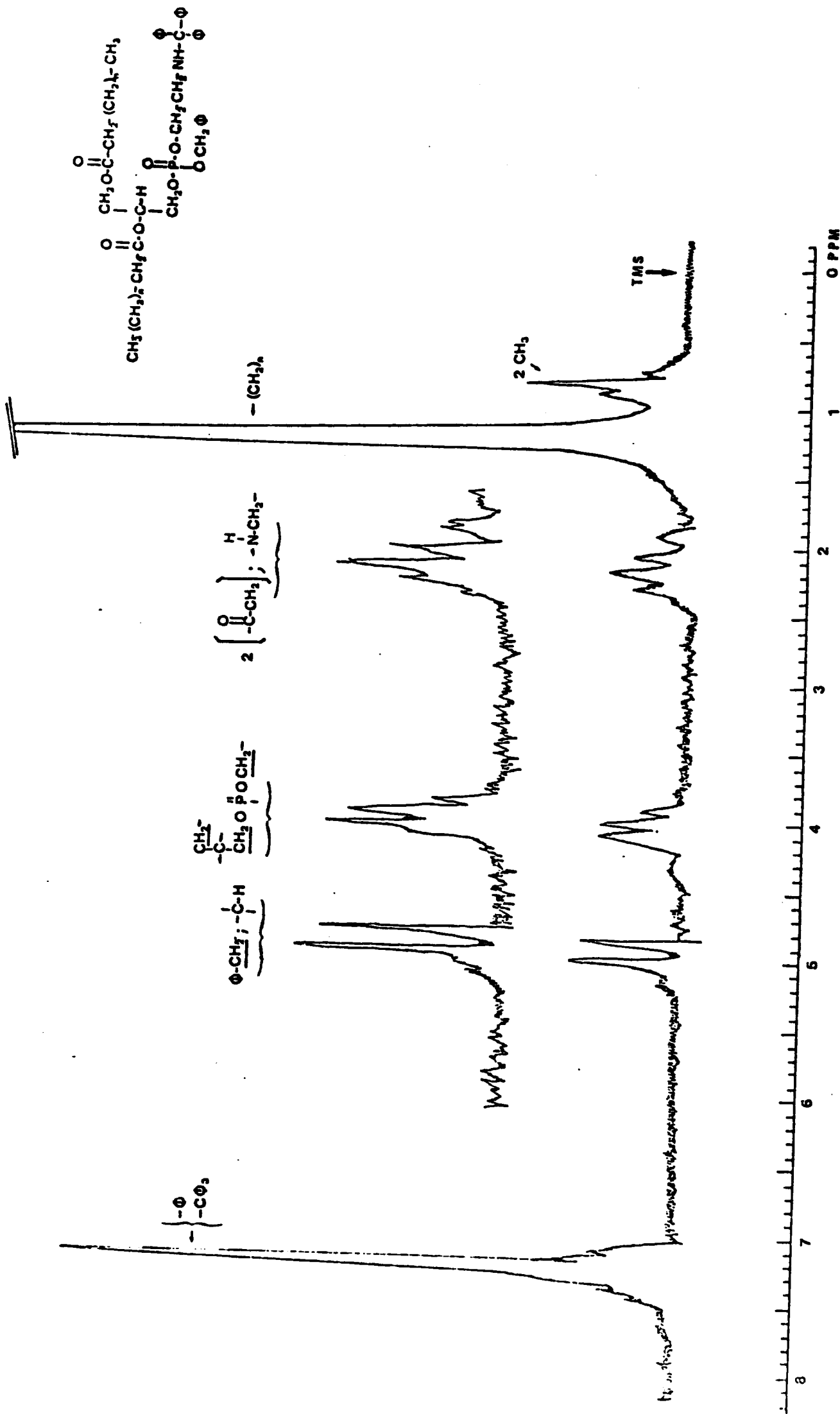
a) Sel d'argent de l'ester benzylique de l'acide phosphatidique (XIII bis) 2 mCi/mMole

. Sel de sodium

200 mg (0,2 mMole, 0,4 mCi) du dérivé XII et 50 mg (0,33 mMole) d'iodure de sodium sont portés à reflux dans l'acétone anhydre (2 ml) pendant 3 heures.

Dès que la température décroît, nous obtenons un précipité.

Ne pouvant sur de telles quantités espérer purifier ces cristaux, l'acétone est évaporé sous vide et le résidu convenablement séché sous vide dynamique afin d'enlever toute trace d'iodure de benzyle.



Exemple de spectre RMN : N-trityl O-benzyl dipalmitoyl phosphatidyl-éthanolamine.

. Sel d'argent (XIII bis)

Au résidu précédent, sont ajoutés 10 ml d'acétone tiède. En chambre noire rajouter à cette solution, 65 mg (0,38 mMole) de nitrate d'argent dissous dans 3 ml d'eau / acétone : 2 / 1. Il se produit un précipité blanc.

A l'abri de la lumière le mélange réactionnel est alors évaporé sous vide et convenablement séché.

b) Condensation du sel d'argent (XIII bis) sur la iodotrityl-éthylamine

Le résidu précédent est repris par 8 ml de benzène anhydre. Sous courant d'azote, 272 mg (0,66 mMole, 2 fois en excès par rapport au sel d'argent) de iodotrityl-éthylamine dissoute dans 3 ml de benzène sont rajoutés à la solution précédente préalablement chauffée, ce, à l'abri de la lumière.

Porter le mélange au reflux et le maintenir à cette température pendant 5 heures.

Après refroidissement, filtrer le mélange sur Millipore 5 μ .

La chromatographie du mélange réactionnel est effectuée dans le solvant hexane / éther : 1 / 1.

La tâche la plus intense (RF = 0,3) du point de vue de la radioactivité (79 %) est recueillie par chromatographie sur plaque préparative (hexane / éther : 1 / 1, 0,5 % T.E.A.) on obtient alors 116 mg (0,113 mMole) d'une huile translucide (220 μ Ci, 55 % par rapport à XII, A.S. = 1,95 mCi/mMole).

Le spectre R.M.N. confirme la structure du produit attendu (XIV).

1 massif	20 H	7,3 ppm	H aromatiques (trityle et benzyle)
1 multiplet	3 H	5 ppm	2 H du CH ₂ benzylique
			1 H du squelette C ₂ du glycérol

1 multiplet	6 H	4,1 ppm	2 CH ₂ (C ₁ et C ₃) du squelette glycérol O-CH ₂ du squelette éthanolamine
1 massif	6 H	2,2 ppm	2 CH ₂ en α du CO N-CH ₂ du squelette éthanolamine
1 singulet élargi	52 H	1,3 ppm	Hydrogènes de la chaîne de l'acide gras
1 massif	6 H	0,8 ppm	2 méthyles de l'acide gras

c) Dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine 2 mCi/mMole

. Sel de sodium de la trityl-P.E. 2 mCi/mMole (XV)

A 90 mg, 0,088 mMole, 180 μ Ci de XIV dissous dans 5 ml d'acétone anhydre, rajouter 22,5 mg (0,15 mMole) d'iodure de sodium. Après 3 h 30 de reflux, la solution est refroidie à 4°C. On note l'apparition de cristaux dont le P. F. est 33°C. Il n'est pas possible, vu la faible quantité, d'isoler ces cristaux par filtration.

Rajouter alors au mélange 0,15 ml de triéthylamine séchée sur tamis 3⁰ Å après 1 heure à température ambiante, la solution est évaporée sous vide de la pompe à palette et convenablement séchée. Rajouter de l'éther et laver cette phase étherée avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à sec.

. Dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (2 mCi/mMole)

Au résidu de l'étape précédente, rajouter 5 ml d'acide acétique aqueux à 90 %.

Après reflux de 3 minutes le mélange est laissé reposer une nuit à température ambiante. Des cristaux sont apparus (P. F. = 194°C, brunissement vers 140°C). Afin de les extraire, rajouter de l'acétone et filtrer sur un filtre "Millipore" (téflon 5 μ), après avoir laissé le mélange à 4°C.

Nous obtenons ainsi 36 mg de P.E. (0,053 mMole) pour une activité de 107 μ Ci (A.S. = 2 mCi/mMole) soit un rendement de 60 % par rapport au dérivé biprotégé (XIV).

Ainsi, par cette méthode, la P.E. a été synthétisée avec un rendement actif de 21 % par rapport à l'acide palmitique 14 C de départ.

La C.C.M. effectuée dans le solvant : CHCl_3 / MeOH / H_2O : 65 / 25 / 4 (RF = 0,7) en parallèle avec un témoin de phosphatidyl-éthanolamine permet de prouver que ce produit est bien le produit attendu. Ce fait est confirmé par une chromatographie (C.C.M.) dans le solvant chloroforme / méthanol / acide acétique / eau : 80 / 40 / 5 / 7.

La pureté radiochimique est dans ces deux solvants supérieure à 98 %. La P.E. active comme le témoin sont révélés par la ninhydrine et le réactif de Dittmer. Aucune autre tâche n'est décelable par les révélations à l'iode ou à l'acide sulfurique.

- C) Préparation de phosphatidyl-éthanolamine insaturée, de dérivés mixtes et de dérivés lyso par condensation du sel d'argent du diester benzylique et N-trityl-éthylrique de l'acide phosphorique (XIII) sur le diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol (Schémas 9, 10 et 11).

Le sel d'argent (XIII) est préparé en suivant scrupuleusement la référence / 42 /. Bien qu'en apparence simple, cette série de manipulations a demandé un grand nombre d'essais avant d'obtenir le sel XIII pur.

1 - Détermination des conditions de condensation du sel d'argent (XIII) sur les dérivés halogénés (X)

La mise au point de cette manipulation a été faite sur le dérivé dipalmitoyl-bromo ou iodo-glycérol.

La condensation de XIII sur X a été initialement effectuée à l'abri de la lumière dans un ballon au reflux du benzène ou de l'acétonitrile. Dans le benzène, que ce soit le dérivé bromé ou iodé, les rendements sont de l'ordre de 12 à 15 % (4 essais).

Nous avons pensé utiliser la méthode en tube scellé mise au point pour la condensation du sel d'argent (XI).

Les solvants utilisés ont été : benzène + iodure de sodium, acétonitrile ; acétonitrile / benzène : 1/1 ; en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la présence de traces d'humidité.

- Nous avons obtenu une nette amélioration avec des rendements voisins de 50 % comparables d'un solvant à l'autre, pour le dérivé iodé ou bromé.

- Les meilleurs résultats ont été obtenus en mettant 2 à 3 fois la quantité stoechiométrique de sel d'argent et en chauffant 6 heures à 80°C à l'abri de la lumière, en étuve munie d'un dispositif d'agitation efficace.

2 - Dioléyl-1,2 sn-phosphatidyl-éthanolamine 1 mCi/mMole

a) Dioléyl-1,2 bromo-3 sn-glycérol 1 mCi/mMole

Pour prévenir toute oxydation de la double liaison, les manipulations seront faites sous azote chaque fois que possible, les temps entre les différentes manipulations étant réduits au minimum.

Suivant la méthode mise au point, la synthèse a été réalisée en faisant agir le chlorure de l'acide oléique (préparé à l'aide du chlorure d'oxalyle) sur le bromo-sn-glycérol.

La purification est effectuée par passage rapide sur une colonne de silice "H" éluée par le benzène. Cette méthode est la plus rapide et nous donne les meilleurs rendements de purification.

Partant de 10 mMoles (5 mCi) d'acide oléique (^{14}C)-1 (A.S. = 0,5 mCi/mMole) nous obtenons 2,75 g (4 mMoles) (A.S. = 1 mCi/mMole), de dioléyl-sn-bromohydrine sous forme d'un produit visqueux jaune pâle. Le rendement actif est de 80 % par rapport à l'acide.

- S.M.

m/e 682 - 684 , 8 % , M^+ ; m/e 401 - 403 , 49 % (M-RCOO^+) ;
m/e 265 , 100 % (RCO^+).

- R.M.N.

Triplet	5,3 ppm	4 H	éthyléniques
Massif	5,1 ppm	1 H	H du squelette glycérol
Multiplet	4,5 ppm	2 H	CH_2 (C_3) du squelette glycérol
Doublet dédoublé	3,7 ppm	2 H	CH_2 (C_1) du squelette glycérol

Massif	2 ppm	12 H	2 (CH ₂ CO) et 4 (CH ₂ -C = C -
Singulet déformé	1,25 ppm	44 H	CH ₂ de la chaîne des acides gras
Massif	0,8 ppm	6 H	Méthyles

- C.C.M. hexane / éther : 3/2 - RF = 0,5
benzène RF = 0,6

b) Condensation avec le sel d'argent

La condensation est effectuée avec deux fois l'excès de sel d'argent dans le benzène en présence de traces d'iodure de sodium.

Il faut noter que dans les mêmes conditions de dilution que celles utilisées pour la dipalmitoyl-bromohydrine, la solution hétérogène prend en masse. Il est donc absolument nécessaire de diluer environ 3 fois.

Ainsi 1,75 mMole (1,75 mCi) de bromohydrine et 4 mMoles (2,3 g) du sel d'argent XIII sont mises à réagir en ampoule scellée sous vide pendant 9 heures à 85°C pour compenser la dilution, ce, avec agitation à l'abri de la lumière.

Une chromatographie sur plaque préparative hexane / éther : 1/1 (T.E.A. 1 %) permet de récupérer 875 mg, 800 μ Ci (A.S. = 0,98 mCi/mMole) du triester phosphorique sous forme d'huile épaisse, soit un rendement de 46 % par rapport à la bromohydrine.

- R.M.N.

1 massif	7,4 ppm	20 H	Protons aromatiques
1 triplet déformé	5,3 ppm	5 H	4 H éthyléniques 1 H du squelette glycérol
1 doublet	5 ppm	2 H	- CH ₂ -O-P
1 massif	4,1 ppm	6 H	CH ₂ -O-CO, 2 (CH ₂ -O-P) C

1 massif	2 ppm	10 H	$(-C-CH_2-N) (CH_2-\overset{\overset{O}{ }}{C}) (CH_2-C=C-)$
1 singulet déformé	1,25 ppm	58 H	Autres méthylènes de la chaîne
1 massif	0,8 ppm	6 H	2 méthyles de l'acide oléique

REMARQUE

Les dérivés dipalmitoylés (XIV) préparés par ce schéma sont identiques aux dérivés XIV préparés selon le schéma 7 (C.C.M., R.M.N.).

c) Débenzylation, détritulation, obtention de la dioléyl sn-phosphatidyl-éthanolamine 1 mCi/mMole

. Débenzylation

Etant donné la présence de la double liaison, il n'est pas possible d'enlever le groupe benzyle par hydrogénation catalytique.

Cette débenzylation est effectuée par l'iodure de sodium dans l'acétone au reflux.

Une solution de 120 mg d'iodure de sodium sec dans 10 ml d'acétone anhydre et 800 mg, 0,6 mMole (600 μ Ci) de triester est portée à reflux pendant 3 heures sous azote en présence de gouttelettes de mercure.

La solution refroidie est traitée avec 1 ml de triéthylamine, laissée au repos 1 heure à température ambiante puis évaporée sous vide à 40°C. L'huile résiduelle est extraite à l'éther, et après filtration et évaporation le sel de sodium est obtenu sous forme d'huile.

. Détritulation

L'huile, reprise dans 10 ml d'acide acétique 90 %, est portée à reflux pendant 3 minutes sous azote, puis laissée au repos pendant une nuit à température ambiante.

Après avoir ajouté 1 ml d'HCl N, la solution est évaporée.

Un contrôle par C.C.M. montre que le rendement de formation de la P.E. est de 90 % mais indique la présence d'impuretés inactives, visibles à l'iode.

La méthode de purification décrite dans la publication ne peut être suivie (cristallisation à -78°C ...).

Une tentative de purification sur une colonne de LH 20 ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$: 3/1) permet de séparer les impuretés inactives, mais il reste 10 % d'un produit actif migrant au front.

Seule une chromatographie sur plaque préparative ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$: 65 / 25 / 4) permet d'obtenir 330 mg (0,445 mMole) 450 μCi , A.S. = 0,99 mCi/mMole, d'un produit pâteux à température ambiante. Le rendement actif est de 75 % par rapport au triester.

Les contrôles effectués dans les solvants $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$: 65 / 25 / 4, et $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{AcOH} / \text{H}_2\text{O}$: 80 / 40 / 5 / 7, en présence de P.E. témoin, montrent que la P.E. a une pureté radiochimique supérieure à 99 % et qu'il n'y a aucune autre impureté visible à l'iode, à l'U.V., à la ninhydrine, au réactif de Dittmer ou à l'acide sulfurique.

Un contrôle de la configuration absolue ⁽⁺⁾ de cette P.E. a été effectué à l'aide de la phospholipase A (E.C. 3.1.1.4) du venin de *Crotalus Adamanteus*, l'hydrolyse de l'acide gras en position 2 étant effectuée à l'interface d'un mélange éther / tampon TRIS pH 7,5.

L'action de l'enzyme est suivie par C.C.M. ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$). La phosphatidyl-éthanolamine active (RF = 0,7) disparaît tandis qu'apparaissent simultanément, et avec le même pourcentage de radioactivité, l'acide gras libéré (RF = 1) et la lyso-phosphatidyl-éthanolamine ainsi produite (RF = 0,35).

(+) Je remercie le Docteur C. WOLF (C.H.U. St-Antoine, Service du Pr. POLONOVSKI) de m'avoir initié à ces techniques.

3 - Préparation de dérivés mixtes : synthèse de palmitoyl (¹⁴C)-1
oléyl(¹⁴C)-2 bromo-3 sn-glycérol 0,8 mCi/mMole

a) Palmitoyl-1 bromo-3 sn-glycérol 0,5 mCi/mMole

4 mMoles (2 mCi) de chlorure d'acide palmitique dissous dans 10 ml de benzène anhydre sont ajoutés très lentement à 12 mMoles (3 fois la quantité théorique) de bromoglycérol dissous dans 1 ml de pyridine anhydre et 2 ml de benzène anhydre.

Il est nécessaire de garder une forte agitation afin de maintenir le bromoglycérol en suspension.

Après 48 heures à température ambiante, une C.C.M. (hexane / éther : 3 / 1) montre la présence d'une tache active (60 % environ) à un R.F. voisin de celui de l'acide palmitique.

Après filtration du chlorure de pyridinium, laver à l'acide sulfurique dilué, puis à l'eau (émulsions très importantes) ; après avoir séché et évaporé la phase organique, introduire le mélange sur une colonne de "silice H" éluée par l'éther.

On recueille 632 mg, 800 μ Ci (A.S. = 0,49 mCi/mMole). d'un produit solide blanc. Le rendement est de 40 % par rapport à l'acide palmitique ¹⁴C.

Sa structure est confirmée par R.M.N. et S.M. comme étant celle du dérivé monoacylé du bromoglycérol.

- R.M.N.

Doublet	4 ppm	2 H	CH ₂ Br
Multiplet	3,7 ppm	1 H	Squelette glycérol
Doublet	3 ppm	2 H	CH ₂ OCO
Massif	2,8 ppm	1 H	Proton hydroxyle
Massif	2 ppm	2 H	CH ₂ CO
Singulet élargi	1,2 ppm	26 H	Méthylènes
Massif	0,7 ppm	3 H	Méthyle

- S.M.

m/e 392 - 394 , 8 % , M^+ ; m/e 299 , 20 % $(M-CH_2Br)^+$; m/e 270 , 35 % $(CH_3(CH_2)_{14}COOCH_2 + H)^+$; m/e 255 , 16 % $(RCOO)^+$; m/e 239 , 100 %

$CH_3(CH_2)_{14}CO^+$; m/e 196 - 198 , 47 % ; m/e 98 , 92 % ; m/e 43 , 100 % , CH_3CO^+ .

b) Palmitoyl-1 oléyl-2 bromo-3 sn-glycérol 0,8 mCi/mMole

A 1 mMole (0,5 mCi) de monopalmitoyl-bromo-glycérol dissous dans 2 ml de benzène anhydre, rajouter 1,5 mMoles (0,5 mCi) de chlorure d'acide oléique dissous dans 0,3 ml de pyridine anhydre (3 mMoles) et 2 ml de benzène.

Après 48 heures à température ambiante, une C.C.M. (hexane / éther : 3 / 1) montre la présence d'un produit nouveau (80 % de la radioactivité) au R.F. = 0,8. Le mélange réactionnel est introduit dans une ampoule à décanter ; rajouter quelques ml de benzène.

Après lavage avec H_2SO_4 dilué, puis avec de l'eau, et séchage, la phase organique est chromatographiée sur une colonne de 100 g de "silice H" éluee par le benzène.

On recueille 650 μ Ci (rendement actif : 81 %) d'un produit liquide translucide dont le poids est de 550 mg (A.S. = 0,8 mCi/mMole).

La structure est confirmée par R.M.N. et S.M.

- R.M.N.

1 massif	5,5 ppm	3 H	2 H éthyléniques, H du squelette glycérol
1 massif	4,5 ppm	2 H	CH_2Br
1 doublet	3,65 ppm	2 H	CH_2O

1 massif	2,3 ppm	10 H	3 (CH ₂ CO) et 2 CH ₂ en α de la double liaison
1 singulet déformé	1,4 ppm	62 H	Méthylènes des acides gras
1 massif	0,9 ppm	6 H	2 méthyles

- S.M.

m/e 656 - 658 , 1 % , M⁺ ; m/e 401 - 403 , 8 % (M-Pal COO)⁺ ; m/e 375 - 377 , 12 % (M-OI COO)⁺ ; m/e 265 , 33 % (OICO)⁺ ; m/e 264 , 100 % ; m/e 239 , 28 % (Pal CO)⁺.

Le fait d'avoir obtenu ce composé, allié à la mise au point de la condensation avec le sel d'argent XIII ainsi que les traitements ultérieurs débenzylation et détritulation mis au point sur le dérivé dioléique, permettent donc d'obtenir les dérivés mixtes de phosphatidyl-éthanolamine.

4 - Synthèse de lyso-palmitoyl D,L-phosphatidyl-éthanolamine 1 mCi/mMole

a) D,L-tritylbromoglycérol

Sous azote sec, rajouter lentement 18 mMoles (5,8 g) de bromure de trityle dissous dans 10 ml de benzène anhydre à une solution préalablement refroidie de 20 mMoles (3,2 g) de D,L-bromoglycérol dissous dans 10 ml de pyridine anhydre.

Après agitation une nuit à température ambiante, filtrer et évaporer à sec sous vide.

Une C.C.M. sur plaque de silice éluee par le benzène indique la présence de deux composés visibles en U.V. (R.F. = 0,5 et 0,6).

Différents essais de purification sur "silice H" éluee par le benzène en présence de triéthylamine n'ont pas amené de purification satisfaisante.

Par contre, sur une colonne de gel d'exclusion "Séphadex LH 20" équilibrée et éluée par du chloroforme, on obtient une nette séparation des deux produits.

Le produit attendu (R.F. = 0,5) est élué en premier, le deuxième produit étant un dérivé très riche en protons aromatiques.

Il se présente sous forme d'un liquide visqueux jaune pâle dont la caractérisation est effectuée par S.M. et R.M.N.

- R.M.N.

Massif	7,3 ppm	15 H	H aromatiques
Massif	3,5 ppm	1 H	H du squelette glycérol
Multiplet centré sur 3	ppm	4 H	CH ₂ O et CH ₂ Br
Singulet	2,2 ppm	1 H	H alcoolique

- S.M.

m/e 396 - 398 , 9 % , M⁺ ; m/e 319 - 321 (M - Φ)⁺ ; m/e 244 , 2 % ;
m/e 243 , ⁺CΦ₃ ; m/e 183 , 23 % ; m/e 165 , 43 % ; m/e 105 , 35 % ;
m/e 77 , 13 % , ⁺.

b) Estérification par le chlorure d'acide palmitique

1 mMole du produit précédent est mise à réagir avec 1 mMole (1 mCi) de chlorure d'acide palmitique en présence de 2 mMoles (0,2 ml) de pyridine anhydre dans 3 ml de benzène anhydre.

Après 48 heures la réaction est arrêtée, après filtration, évaporation et reprise dans le benzène, le produit de condensation est isolé par chromatographie sur plaque préparative (solvant : benzène) (R.F. = 0,15). On obtient 500 mg, 775 μCi, A.S. = 1 mCi/mMole (soit 78 % de rendement) d'un produit visqueux jaune pâle.

- R.M.N.

Massif	7,4 ppm	15 H	Protons aromatiques
Massif	5,1 ppm	1 H	Squelette glycérol
Doublet J = 6 hz	3,5 ppm	2 H	CH ₂ Br
Doublet J = 5 hz	3,3 ppm	2 H	CH ₂ O
Massif	2,2 ppm	2 H	CH ₂ CO
Singulet déformé	1,3 ppm	26 H	Méthylènes
Massif	0,8 ppm	3 H	Méthyle

- S.M.

m/e 634 - 636 , 3 % , M⁺ ; m/e 378 - 376 , 12 % ; m/e 377 - 375 , 56 %
 (M-OC Φ₃)⁺ ; m/e 299 , 25 % ; m/e 260 , 40 % ; m/e 259 , 67 % (CΦ₃O)⁺ ;
 m/e 244 , 71 % ; m/e 243 , 100 % ; m/e 105 , 64 %.

c) Condensation avec le sel d'argent

En conditions anhydres, 0,22 mMole (0,22 mCi) du dérivé bromotryl-palmitoyl-glycérol, 0,5 mMole (290 mg) du sel d'argent, quelques mg d'iodure de sodium sont mis à réagir dans 2 ml de benzène en tube scellé sous vide. La température est portée à 80°C et maintenue pendant 5 heures avec agitation, à l'abri de la lumière.

Après filtration, le mélange réactionnel est disposé sur une plaque préparative développée par le mélange hexane / éther : 1 / 1, T.E.A. 1 %. La tâche dont le R.F. est 0,2 est éluee.

On obtient 100 mg d'un produit visqueux jaune pâle dont l'activité est 126 μCi ; rendement 57 % (A.S. = 1 mCi/mMole).

- R.M.N.

Massif	7,4 ppm	20 H	Protons aromatiques
Massif	5,2 ppm	1 H	Squelette glycérol
Doublet J = 84 hz	5 ppm	2 H	CH ₂ benzyliques
Massif	4,1 ppm	4 H	2 (CH ₂ O-P)
Massif	3,2 ppm	2 H	CH ₂ -OC ₃
Massif	2,2 ppm	4 H	CH ₂ CO et CH ₂ N
Singulet élargi	1,2 ppm	24 H	Méthylènes
Massif	0,8 ppm	3 H	Méthyle

d) Déprotection

60 mMoles (60 μ Ci) du dérivé précédent sont mis dans 3 ml d'acétone anhydre dans lesquels sont dissous 15 mg d'iodure de sodium sec. Après un reflux de 5 heures, le mélange est porté à sec.

La détritylation est effectuée par reflux du résidu précédent dans 5 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 90 % pendant 3 minutes.

La solution est alors abandonnée la nuit à température ambiante.

Les C.C.M. indiquent un rendement actif de formation de la D,L-lyso-phosphatidyl-éthanolamine de 95 % mais aussi la présence d'impuretés inactives.

Après une chromatographie préparative sur plaque effectuée dans le mélange CHCl₃ / MeOH / H₂O : 65 / 25 / 4, la L.P.E. est recueillie (175 mg, 40 μ Ci, A.S. = 1 mCi/mMole, 75 % par rapport au triester) sous forme d'un produit solide blanc.

Dans les solvants CHCl₃ / MeOH / H₂O : 65 / 25 / 4 (R.F. = 0,35) et CHCl₃ / MeOH / AcOH / H₂O : 80 / 40 / 5 / 7 (R.F. = 0,48), la pureté radiochimique de la D,L-L.P.E. est supérieure à 99 %. Aucune autre tâche n'est décelable lors des révélations par l'iode, la ninhydrine, le réactif de Dittmer ou l'acide sulfurique.

D) Synthèses des différentes classes de phospholipides marqués à partir de l'acide phosphatidique (Schéma XV)

1 - Acide dipalmitoyl-phosphatidique (P.A.) (1 mCi/mMole)

L'acide phosphatidique est préparé à partir de l'ester dibenzylé par hydrogénéation catalytique / 31 /.

Une suspension de 100 mg (0,12 mMole) de phosphatidate bis-benzylé (XII) dans 2 ml d'éthanol absolu, en présence de catalyseur Pd / C 10 % est agitée à température ambiante en atmosphère d'hydrogène (légère surpression) durant 3 heures.

Les chromatographies chloroforme / éther : 9 / 1 ; éther / éthanol / acide acétique / eau : 75 / 1,5 / 1 / 1 , permettent de noter la disparition totale du dérivé benzylé.

L'acide phosphatidique, alors soluble dans l'éthanol est récupéré après filtration, lavages du catalyseur et évaporation de l'alcool, 65 mg, 0,1 mCi, A.S. = 1 mCi/mMole.

Le rendement actif en acide phosphatidique par rapport au dérivé dibenzylé est de 85 %.

L'acide phosphatidique libre est un composé très instable. Il est nécessaire d'effectuer la débenzylation juste avant de procéder à la condensation avec l'alcool protégé.

2 - Préparation de dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (1 mCi/mMole et 20 mCi/mMole)

a) Condensation avec la N-trityléthanolamine (XVII)

Cette manipulation est effectuée en s'inspirant du protocole expérimental décrit dans la référence / 69 /.

En boîte à gants, 70 mg de N-trityléthanolamine (0,23 mMole) sont mis à réagir avec 100 mg (0,33 mMole) de T.P.S. dans 2,5 ml de pyridine anhydre durant une demi-heure à température ambiante.

Au bout de ce temps, l'acide phosphatidique 0,1 mMole, dissous dans la pyridine (2 ml) est rajouté au mélange précédent.

Laisser agir à température ambiante pendant 2 heures. Rajouter 1 ml de chloroforme sec et libre d'éthanol, maintenir l'agitation durant encore 1 h 30.

Les chromatographies sont effectuées dans différents solvants CHCl_3 / MeOH, avec comme témoin une phosphatidyl-éthanolamine N-tritylée que nous avons préparée / 94 / et purifiée sur une colonne de "Séphadex" LH 20 dans le chloroforme.

Le rendement actif de formation de XVII, déterminé par enregistrement des C.C.M., par rapport à l'acide phosphatidique, est de l'ordre de 55 %. Il est important, avant de faire ces C.C.M., d'évaporer à sec le mélange réactionnel. Si cette précaution n'est pas prise, la répartition de la radioactivité est faussée par la présence des sels de pyridinium.

b) Déprotection

Comme dans le cas précédent, la tritylphosphatidyl-éthanolamine est déprotégée par reflux dans l'acide acétique aqueux 90 % et précipitée par addition d'acétone et trituration à froid.

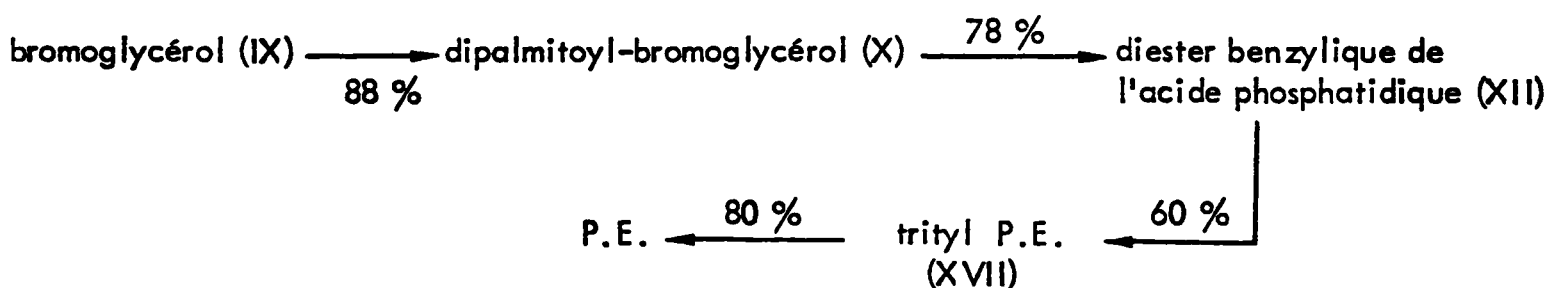
Nous obtenons 30 mg (44 μ Ci) (A.S. = 1 mCi/mMole) d'un produit cristallisé, blanc, dont le point de fusion est 192°C, de pureté radiochimique supérieure à 96 % ; le rendement actif est de 80 % par rapport au dérivé tritylé.

La comparaison avec une P.E. témoin et une P.E. faiblement active obtenue lors d'essais précédents, par une autre voie de synthèse, est effectuée par C.C.M. dans les solvants CHCl_3 / MeOH / H_2O : 65 / 25 / 5 et chloroforme / méthanol / acide acétique / eau : 80 / 40 / 5 / 7. Les différentes P.E. témoin et actives sont identiques.

3 - Synthèse de dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (20 mCi/mMole)

De même, nous avons par cette méthode préparé la dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine d'activité spécifique 20 mCi/mMole.

Le protocole expérimental est identique au précédent, les rendements sont récapitulés dans le tableau suivant :



Le rendement actif en P.E. par rapport à l'acide palmitique est de 33 %.

A noter que lors de cet essai actif (20 mCi/mMole) le produit XVII a été isolé par chromatographie sur colonne "Merck" prête à l'emploi, éluée par le mélange CHCl_3 / MeOH / T.E.A. : 92 / 8 / 0,5.

4 - Dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (1 mCi/mMole)

a) Acétate de choline

Une solution de chlorure de choline est lentement filtrée sur un lit de carbonate d'argent reposant sur un fritté.

L'éluat basique est directement collecté dans un erlen contenant une solution diluée d'acide acétique préalablement refroidie.

Après évaporation sous vide et séchage, on obtient le sel neutre d'acétate de choline dont la structure est confirmée par la R.M.N. du carbone ^{13}C .

- R.M.N. ^{13}C

Singulet	180 ppm	Carbonyle
Triplet	68 ppm	CH_2 en α de l'azote
Singulet	57 ppm	CH_2 en α de l'hydroxyle
Triplet	55 ppm	3 Méthyles de l'ammonium
Singulet	22 ppm	Méthyle en α du carbonyle

Les triplets s'expliquent par un couplage avec l'ammonium quaternaire.

b) Condensation sur l'acide phosphatidique

A 0,1 mMole (100 μCi) d'acide phosphatidique dipalmitoylé et 0,2 mMole (35 mg) d'acétate de choline soigneusement séchés sous vide, ajouter 0,3 mMole (95 mg) de T.P.S. dissous dans 5 ml de pyridine.

Sous azote et avec agitation, le mélange est chauffé 1 heure à 70°C puis agité à température ambiante pendant 4 heures.

Après évaporation sous vide, le mélange est extrait par du chloroforme. Après évaporation du solvant, le résidu est redissous dans le mélange $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O} : 65 / 25 / 4$, puis passé lentement sur une colonne de 10 g de DE.52 (OH^-)

mélangé avec 10 g de IRC 50^f (H⁺) afin d'éliminer les sels et régénérer les fonctions acide et basique.

La phosphatidyl choline est isolée du mélange réactionnel par chromatographie sur plaque préparative (CHCl₃ / MeOH / H₂O : 65 / 25 / 4). Le produit blanc obtenu pèse 44 mg pour une activité de 60 μCi (A.S. = 1 mCi/mMole), soit un rendement actif de 60 % par % à l'acide phosphatidique. Les contrôles par C.C.M. dans les solvants CHCl₃ / MeOH / H₂O : 65 / 25 / 4 (R.F. = 0,35) et CHCl₃ / MeOH / AcOH / H₂O : 80 / 40 / 5 / 7 (R.F. = 0,55, tâche élargie due à la formation de sels) permettent de prouver la structure et d'indiquer que la pureté est de 99 %.

5 - Dipalmitoyl-phosphatidyl-sérine (1 mCi/mMole)

A 0,25 mMole (0,25 mCi) d'acide dipalmitoyl-phosphatidique, 0,05 mMole (130 mg) de L-sérine protégée et 0,75 mMole (230 mg) de T.P.S., rajouter 5 ml de pyridine anhydre, chauffer 1 minute à 70°C puis agiter 3 heures à température ambiante. Après avoir ajouté 1 ml de chloroforme anhydre, laisser la réaction se produire 1 heure supplémentaire puis l'arrêter par addition d'eau.

Différentes C.C.M., CHCl₃ MeOH : 5, 7 ou 10 %, indiquent la présence d'un produit phosphoré, actif (60 % de la radioactivité totale).

Un essai de déprotection (bullage HCl) effectué sur une moitié du produit réactionnel n'ayant pas donné des résultats nets, l'autre moitié (110 μCi) est fractionnée par chromatographie sur plaque préparative (CHCl₃, MeOH : 7 %).

On recueille la fraction ayant un R.F. de 0,8 (55 μCi ; rendement 50 % par rapport à l'acide phosphatidique) (XVIII).

Cette fraction XVIII est dissoute dans 100 ml de chloroforme anhydre. La déprotection simultanée de la fonction amine et carboxyle est effectuée en faisant

buller de l'HCl gazeux dans le mélange chloroformique à 0°C, suivant la réaction par C.C.M. ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{AcOH} / \text{H}_2\text{O}$) avec de la P.S. inactive témoin.

Après 5 heures de bullage à 0°C et arrêt du bullage, la solution chloroformique acidifiée est maintenue à - 20°C une nuit. Effectuer ensuite une chromatographie sur plaque préparative dans le solvant CHCl_3 , MeOH, H_2O .

Le produit élué 15 mg (20 μCi , A.S. = 1 mCi/mMole, 36 % par rapport au dérivé diprotégé (XVIII)) a une migration identique à la P.S. témoin dans les solvants CHCl_3 , MeOH, ACOH, H_2O : 80 / 40 / 5 / 7 et 65 / 25 / 0 / 4.

La P.S. est révélée par la ninhydrine et le réactif de Dittmer.

Aucune autre tâche n'est révélabale par le réactif de Dittmer, par la ninhydrine, par les vapeurs d'iode, ou par l'acide sulfurique.

La pureté radiochimique déterminée par l'enregistrement des chromatogrammes est de 97 %.

REMARQUE

Une nouvelle méthode permettant l'enlèvement simultané des groupes t.butoxycarbonyle et t.butylique lors de la synthèse peptidique a été publiée / 129 /. Cette bi-déprotection s'effectue par traitement du peptide protégé par le perchlorate de triméthylsilyle ($(\text{H}_3\text{C})_3 \text{Si ClO}_4$) à 24°C, en solution dans le benzène ou le chlorure de méthylène.

Une telle déprotection serait à envisager, lors d'essais ultérieurs, sur la phosphatidyl-sérine protégée.

VOIE ORIGINALE D'ACCES A LA SYNTHÈSE DE PHOSPHOLIPIDES UTILISATION DU "PYROPHOSPHATE D'ENEDIOL CYCLIQUE"

A - Schéma de principe

1 - Généralités

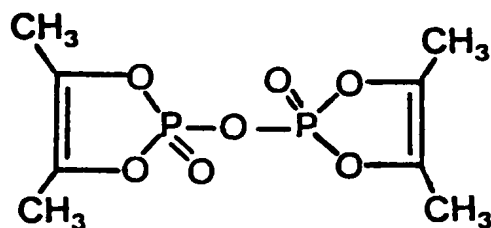
Etant donné l'importance des applications chimiques et biochimiques des dérivés du phosphore (médicaments, insecticides, solvants sélectifs, détergents, produits pour l'ignifugation, produits contre la corrosion, ...) de très nombreuses recherches ont été effectuées sur cette classe de composés.

La synthèse organique y fait de plus en plus appel / 112 - 113 / aussi bien comme groupe protecteur, groupe activant ou groupe partant pour orienter sélectivement l'action d'un réactif, que comme réactif lui-même.

Ces dernières années ont donc naturellement vu un essor de la recherche, notamment dans le domaine des oxyphosphoranes.

Les oxyphosphoranes / 114 / sont des dérivés organiques du phosphore de coordinance 5 dans lesquels au moins un des ligands est l'oxygène. Leur formule générale est $(RO)_{5-n}PX_n$, $n = 0$ à 4. Ces dérivés du phosphore inconnue PH_5 ont des possibilités de synthèse qui n'ont été reconnues que depuis les quelques dernières années / 115 à 117 /.

Très récemment (en 1975) ont été décrites la synthèse et l'utilisation du pyrophosphate "d'enediol cyclique" / 118 - 119 / (XX) :



1 - Synthèse du pyrophosphate XX

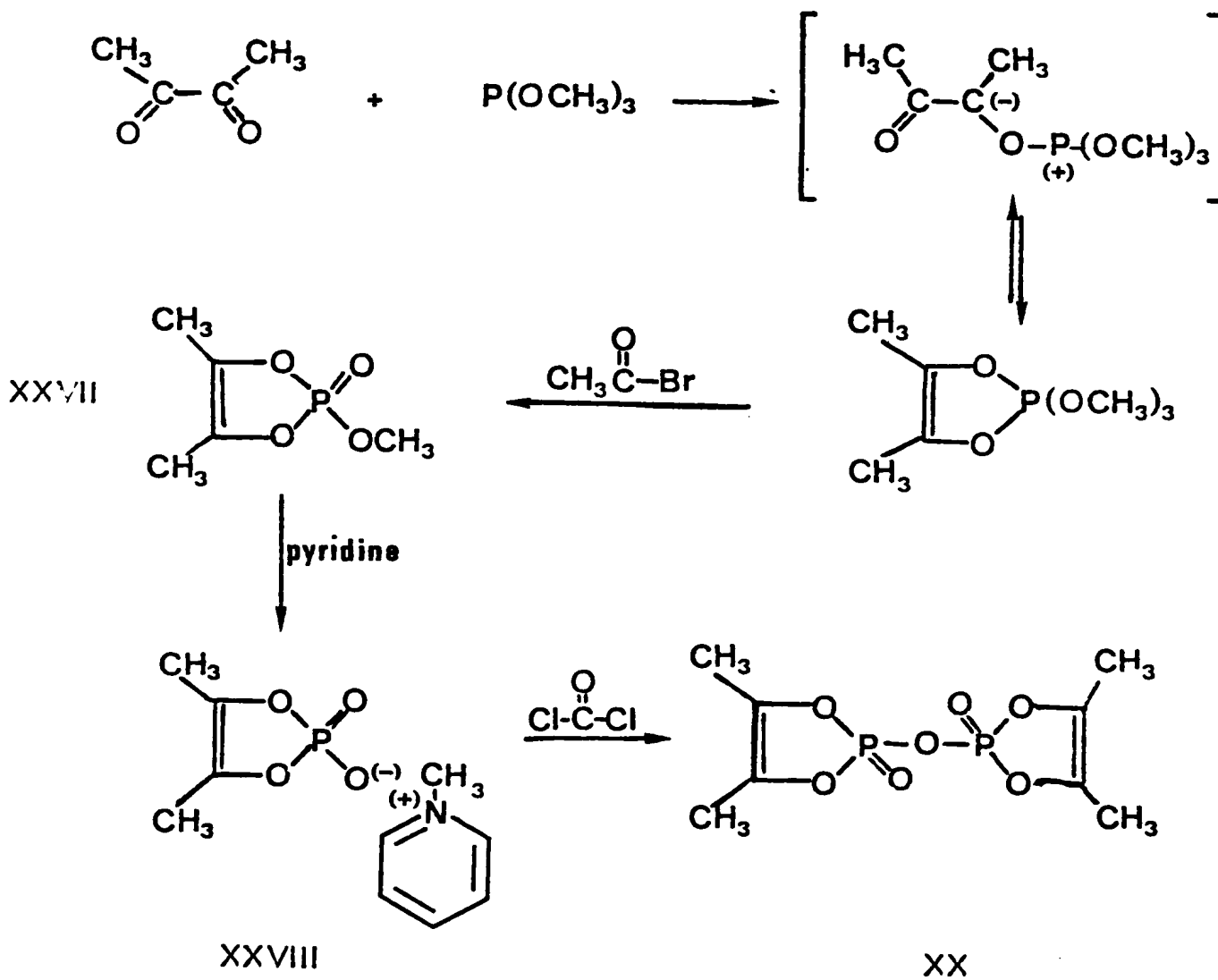


Schéma 21 - Synthèse du pyrophosphate "d'enediol cyclique".

Le diméthyl-4,5 méthoxy-2 oxo-2 dioxaphosphole-1,3,2 (XXVII) est obtenu sous forme cristalline en deux étapes à partir de butane-dione et de triméthylphosphite. Ce composé est transformé alors en pyrophosphate (CEP-O-CEP) (XX) en deux étapes par l'intermédiaire du sel de N-méthyl-pyridinium (XXVIII) lui même isolé sous forme cristalline (Schéma 21).

2 - Son utilisation pour la synthèse de phosphodiesters mixtes

Le pyrophosphate XX présente l'avantage, lorsqu'il est mis en présence d'alcool R_1OH de former l'alcoyl-acétoinyl-énediol-cyclophosphotriester (CEP-OR₁) (XXI) qui lui même réagit sur un alcool primaire R_2OH pour former le phosphotriester mixte XXII (Schéma 19).

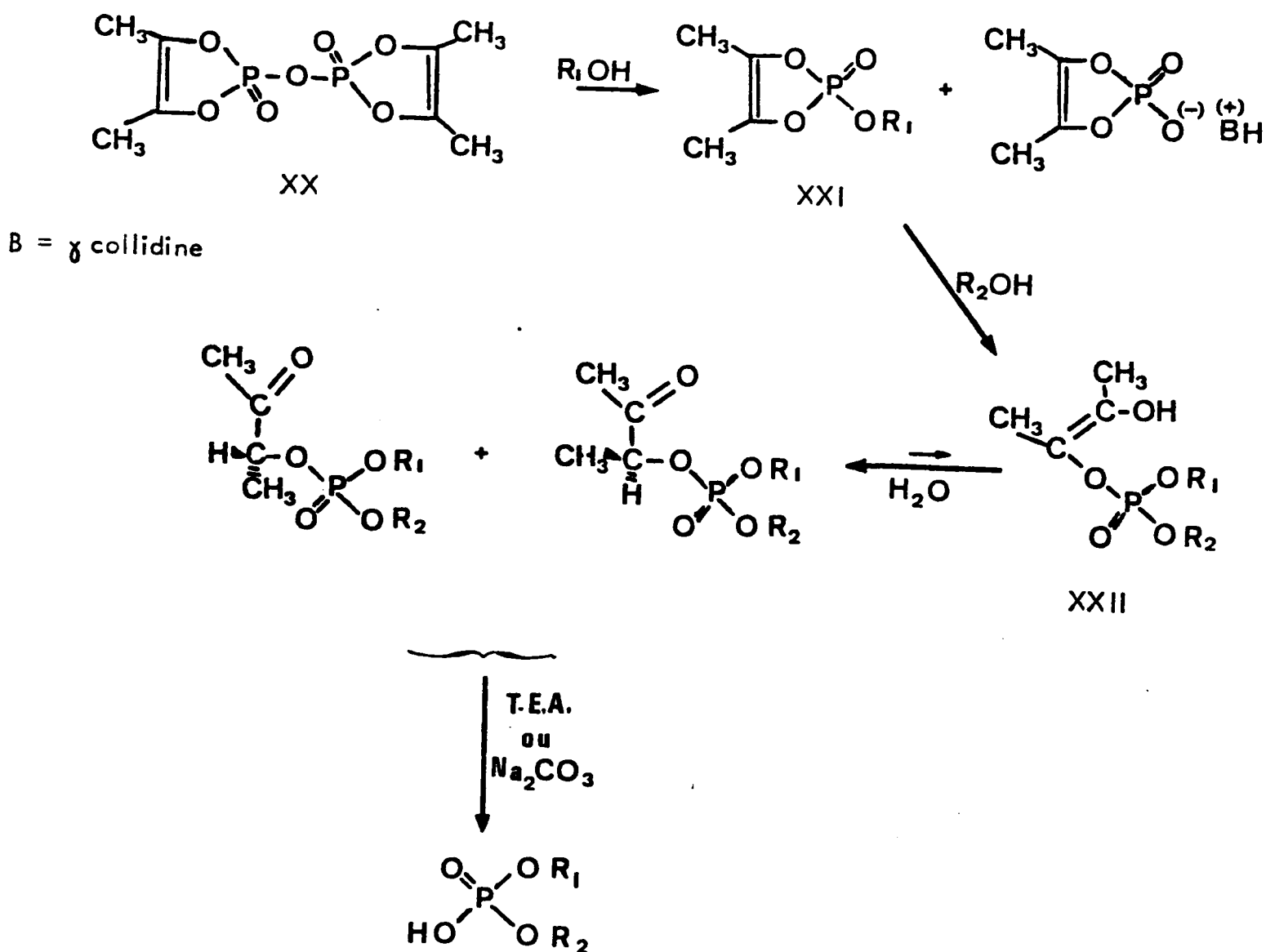


Schéma 19 - Synthèse d'un phosphodiester mixte à partir du "pyrophosphate d'énediol cyclique".

L'enlèvement du groupe acétoïnyle peut alors être effectué par hydrolyse basique / 120 / (triéthylamine ou carbonate de sodium) ; la liaison entre le groupe acétoïnyle et le phosphore est en effet beaucoup plus labile que les autres liaisons esters.

A titre indicatif l'hydrolyse basique de l'acétoïnyl-diméthyl-phosphotriester est 2×10^6 fois plus rapide que celle du triméthyl-phosphotriester (Schéma 20). Cette augmentation de la vitesse peut être expliquée par la nature insaturée du groupe partant avec assistance de la liaison hydrogène, mais aussi par la participation du groupe carbonyle et la formation d'oxyphosphorane lors de l'hydrolyse.

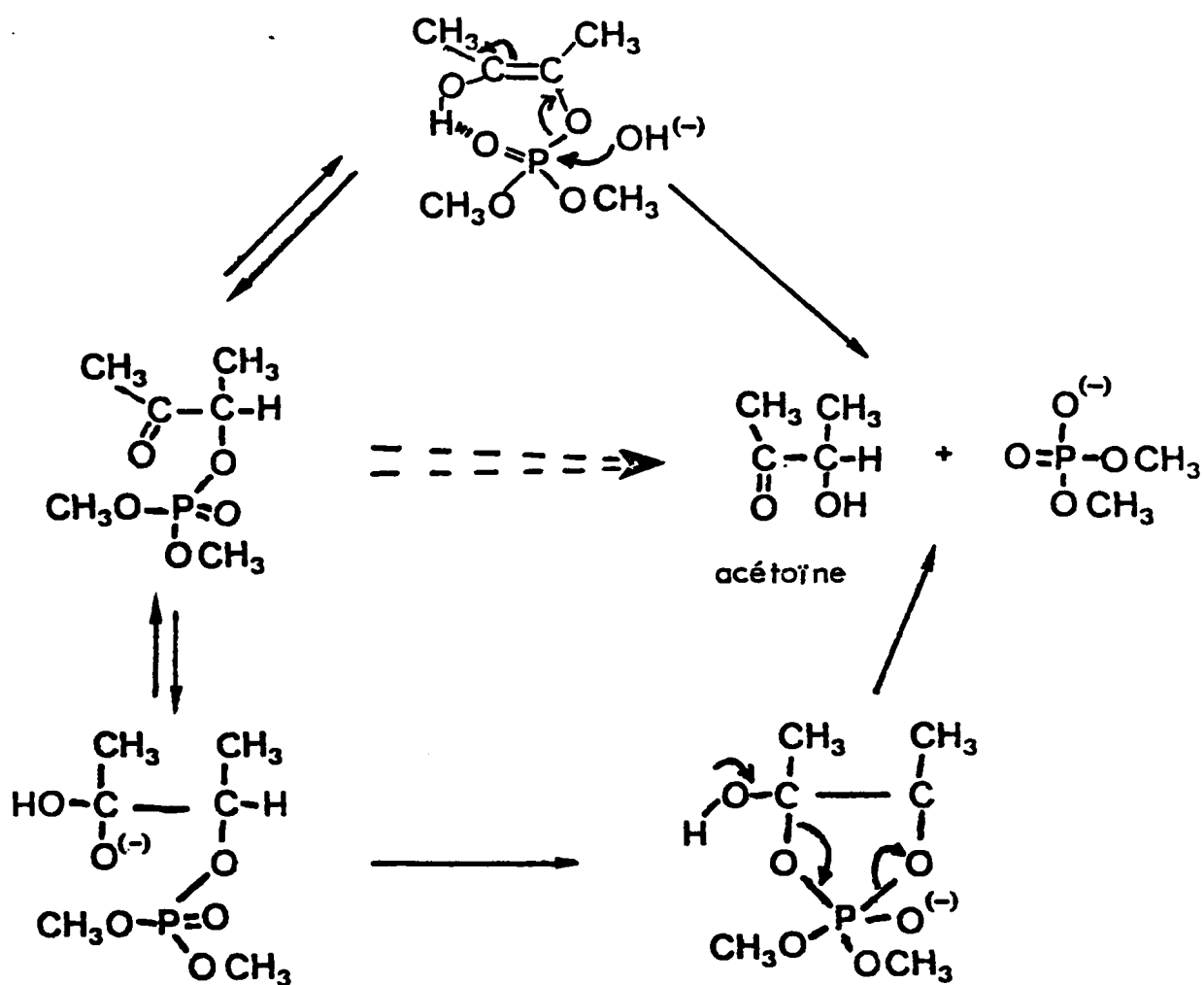


Schéma 20 - Hydrolyse basique de l'acétoïnyl-diméthyl-phosphate.

II - Application de la méthode à la synthèse de phospholipides

Nous avons pensé employer ce pyrophosphate pour la synthèse de phospholipides, utilisation qui, à notre connaissance, n'avait jamais été faite dans ce domaine.

1 - Exposé du schéma de principe

Le schéma de principe est simple :

L'action du pyrophosphate (XX) sur le diacyl-1,2 sn-glycérol devrait conduire à la formation du dérivé phosphotriester cyclique (XXI) (Schéma 22) lui-même réagissant, sans avoir été isolé, sur la fonction primaire d'un alcool (éthanolamine, sucre, glycérol, sérine, ...) convenablement protégé (Schéma 23).

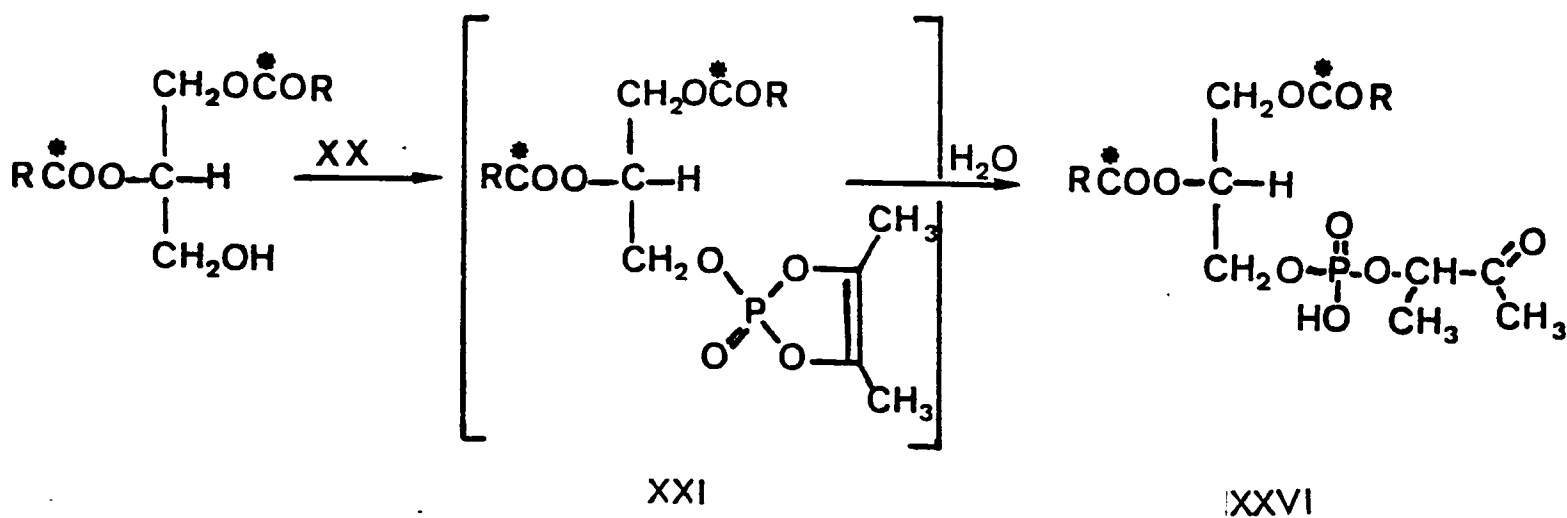
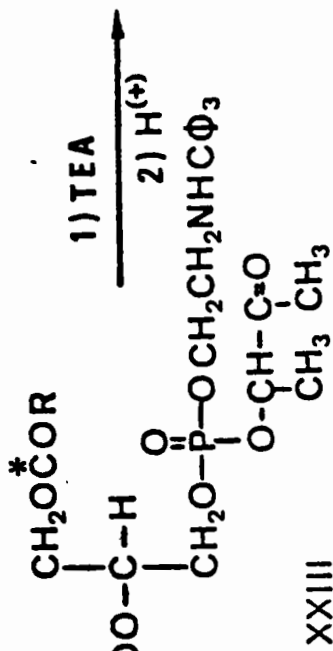
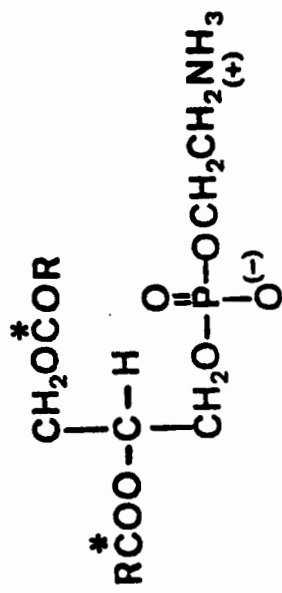


Schéma 22 - Condensation du dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol sur le pyrophosphate XX.

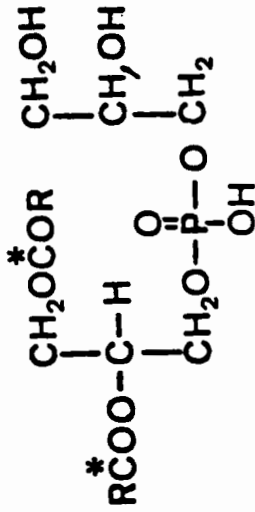
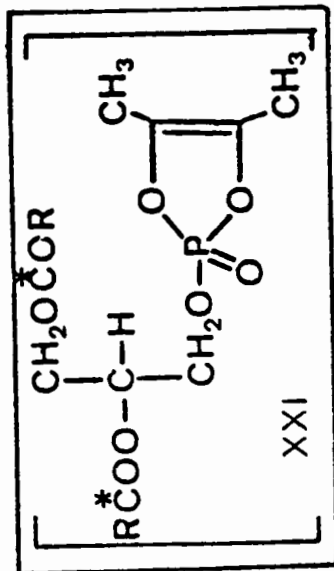
Le phospholipide bi-protégé ainsi formé serait ensuite régénéré en deux temps : groupe protecteur de la molécule d'alcool (méthodes classiques appropriées) puis groupe acétoinyle (hydrolyse basique) ou bien dans l'ordre inverse suivant les cas.

2 - Résultats obtenus, validité de la méthode

Nous avons montré que sur le plan pratique ce schéma de synthèse est applicable au domaine des phospholipides en obtenant la dipalmitoyl sn-phosphatidyl-éthanolamine, le dipalmitoyl sn-glycérol (et un dérivé racémique).

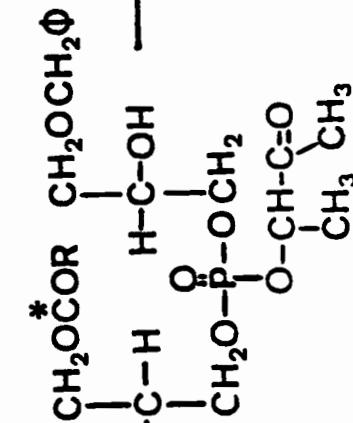
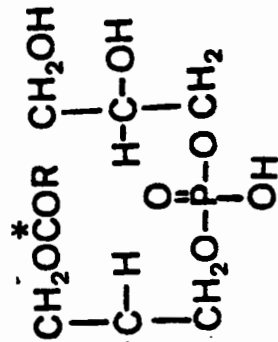


1) TEA
2) H⁽⁺⁾



1) HOCH₂CH(OH)CH₂OH
2) TEA

analogue de P.G.



1) H₂-Pd/C
2) TEA

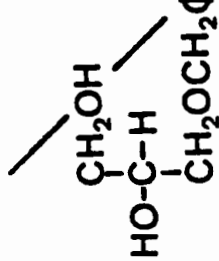


Schéma 23 - Synthèse de phospholipides à l'aide du pyrophosphate "d'énédiol cyclique".

Nous avons, d'autre part, entrepris la synthèse de dérivés glucidiques de phospholipides (phosphatidyl-glucose) (Schémas 22 et 23).

Ces composés synthétisés ont une activité spécifique de 0,5 mCi/mMole (carbonyles des esters palmitiques).

L'utilisation de dipalmitoyl-glycérol marqué a eu, outre l'avantage de fournir des phospholipides marqués, le double intérêt de pouvoir très facilement suivre les rendements de formation des différents composés, et de les localiser aisément pour les purifications. Sur les quantités que nous avons mises en jeu (souvent de l'ordre de 0,02 mMole) il aurait été en effet très difficile de suivre, sans utiliser les molécules marquées, les différentes étapes de la réaction.

a) Synthèse de sn-phosphatidyl-éthanolamine (P.E.)

La condensation de N-trityl-éthanolamine sur l'intermédiaire XXI permet d'obtenir le triester XXIII, isolé par chromatographie sur plaque préparative avec un rendement de 37 % par rapport au dipalmitoyl-glycérol.

Les hydrolyses, basique (T.E.A.) puis acide (acide acétique à 90 %), de la phosphatidyl-éthanolamine acétoïnylée et N-tritylée (XXIII) conduisent à la sn-phosphatidyl-éthanolamine (^{14}C) (0,5 mCi/mMole) avec un rendement de formation de 33 % par rapport à XXIII.

b) Synthèse de sn-phosphatidyl-glycérol de configuration naturelle (P.G.)

La condensation sur XXI du benzyl-3 sn-glycérol conduit au phospholipide protégé XXV isolé avec un rendement de 40 % par rapport au dipalmitoyl-glycérol (^{14}C).

Après hydrogénation sur charbon palladié et hydrolyse basique (T.E.A.), du triester XXV on note par C.C.M. la formation de P.G. avec un rendement de 37 % par rapport à XXV.

REMARQUE

Nous avons pensé utiliser pour cette synthèse la monacétine (ou acétyl-3 sn-glycérol) préparée par acétylation de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol puis hydrolyse acide du groupement isopropylidène. Utiliser le groupe acétyle comme groupement protecteur de la fonction alcool primaire à protéger, présentait l'avantage de pouvoir, en une seule étape, enlever les groupes acétyle et acétoïne par hydrolyse en présence de triéthylamine du phosphatidyl-glycérol acétyl et acétoïnylé.

Des essais préliminaires nous avaient en effet montré que le groupe acétyle de la monacétine est hydrolysé dans les conditions de l'hydrolyse du groupe acétoïne (T.E.A.) ou bien par le méthanol ammoniacal sans que les esters d'acides gras soient détruits.

Or, bien que le phosphatidyl-glycérol acétylé et acétoïnylé ait été obtenu, l'hydrolyse, malgré un excès de triéthylamine n'a pas conduit au P.G., mais à un composé différent du P.G. bi-protégé ayant en C.C.M. un R.F. légèrement supérieur à celui du P.G.

Essayer de prolonger cette hydrolyse par des méthodes plus fortes (méthanol ammoniacal) conduit à la formation de nombreux produits de dégradation.

c) Synthèse de sn-phosphatidyl D, L-glycérol, analogue de P.G. naturel

Le triester XXIV résultant de la condensation sur XXI du glycérol est isolé avec un rendement de 40 % par rapport au dipalmitoyl sn-glycérol.

Par hydrolyse basique (T.E.A.) de XXIV, l'analogue du P.G. naturel est formé avec un rendement de 35 % par rapport au triester XXIV.

d) Synthèse de sn-phosphatidyl-glucose

La condensation du tétrabenzyl-1,2,3,4, ou glucopyranose (préparé par benzylation du trityl-6 benzyl-glucoside) a été effectuée sur le dérivé XXI. Le triester attendu a été isolé avec un rendement de 25 % par rapport au dipalmitoyl-glycérol.

La bi-déprotection du phosphatidyl-glucose benzylé et acétoïnylé a été effectuée, mais l'identification des produits formés est rendue longue et difficile par suite de l'absence de témoin et des très faibles quantités de triester dont nous disposons actuellement.

e) Justification du choix de la méthode d'hydrolyse du groupe acétoïnyle

Dans tous les essais précédents, la méthode d'hydrolyse du groupe acétoïnyle que nous avons retenue est la méthode triéthylamine / pyridine / eau pour des raisons pratiques.

Au cours d'essais préliminaires nous avons testé la résistance de la liaison ester-carboxylique par chauffage du dipalmitoyl-1,2 benzyl-3 sn-glycérol (^{14}C) en présence de triéthylamine ou de carbonate de sodium. Dans les conditions d'hydrolyse de l'acétoïnyle, 12 heures à 70°C dans le premier cas et 6 heures à 60°C dans le second cas, aucune destruction du diester n'avait été observée après chromatographie du milieu réactionnel.

Ce fait vient d'ailleurs d'être confirmé par RAMIREZ et ses collaborateurs dans une publication très récente (Novembre 1976) / 128 / consacrée à la synthèse, par cette méthode, de cardioline de configuration naturelle.

REMARQUE

L'intermédiaire (XXI) en présence d'eau a conduit à l'acide phosphatidique acétoïnylé (XXII). Ce diester phosphorique s'est, comme attendu, avéré très

stable vis-à-vis de la T.E.A. dans les conditions de l'hydrolyse du groupe acétoïne d'un triester phosphorique.

III - Conclusion

Nous pouvons dire que la méthode de Ramirez est applicable à la synthèse de phospholipides en très petite quantité, dans un délai de temps réduit par rapport aux autres méthodes, avec un rendement acceptable et reproductible, tout cela avec un protocole expérimental facile à mettre en oeuvre.

L'avenir de cette méthode, dans ce domaine, est incontestable. Elle peut être élargie à la synthèse de composés encore plus difficiles à obtenir par les méthodes classiques (sphingosine, sphingosyl-phosphoryl-choline, ...).

La meilleure preuve de ce que nous venons d'énoncer est que, alors que nous avons fait communication de ces travaux / 124 / en Juin 1976, RAMIREZ et ses collaborateurs / 121 - 128 / publiaient parallèlement en Juillet et Novembre 1976 des travaux sur la synthèse de dérivés de phospholipides à l'aide du "pyrophosphate d'énediol cyclique".

Des articles très récents, toujours publiés par l'équipe de F. RAMIREZ font mention de la synthèse de dérivés du pyrophosphate / 122 - 123 / encore plus réactifs, réagissant sur deux alcools différents, par un schéma analogue pour donner des phosphodiester mixtes. Il est possible d'en envisager l'utilisation dans ce domaine.

B - Protocole expérimental

1 - Pyrophosphate XX

Le composé XX a été préparé en suivant scrupuleusement le mode opératoire décrit dans la publication originale.

Les rendements et les caractéristiques physico-chimiques (F., R.M.N.) sont ceux annoncés.

Toutes les manipulations ont été effectuées à l'abri de l'humidité (solvants anhydres, courant d'azote) avec un soin particulier pour les filtrations des cristaux hygroscopiques qui ont été réalisées en boîte à gants.

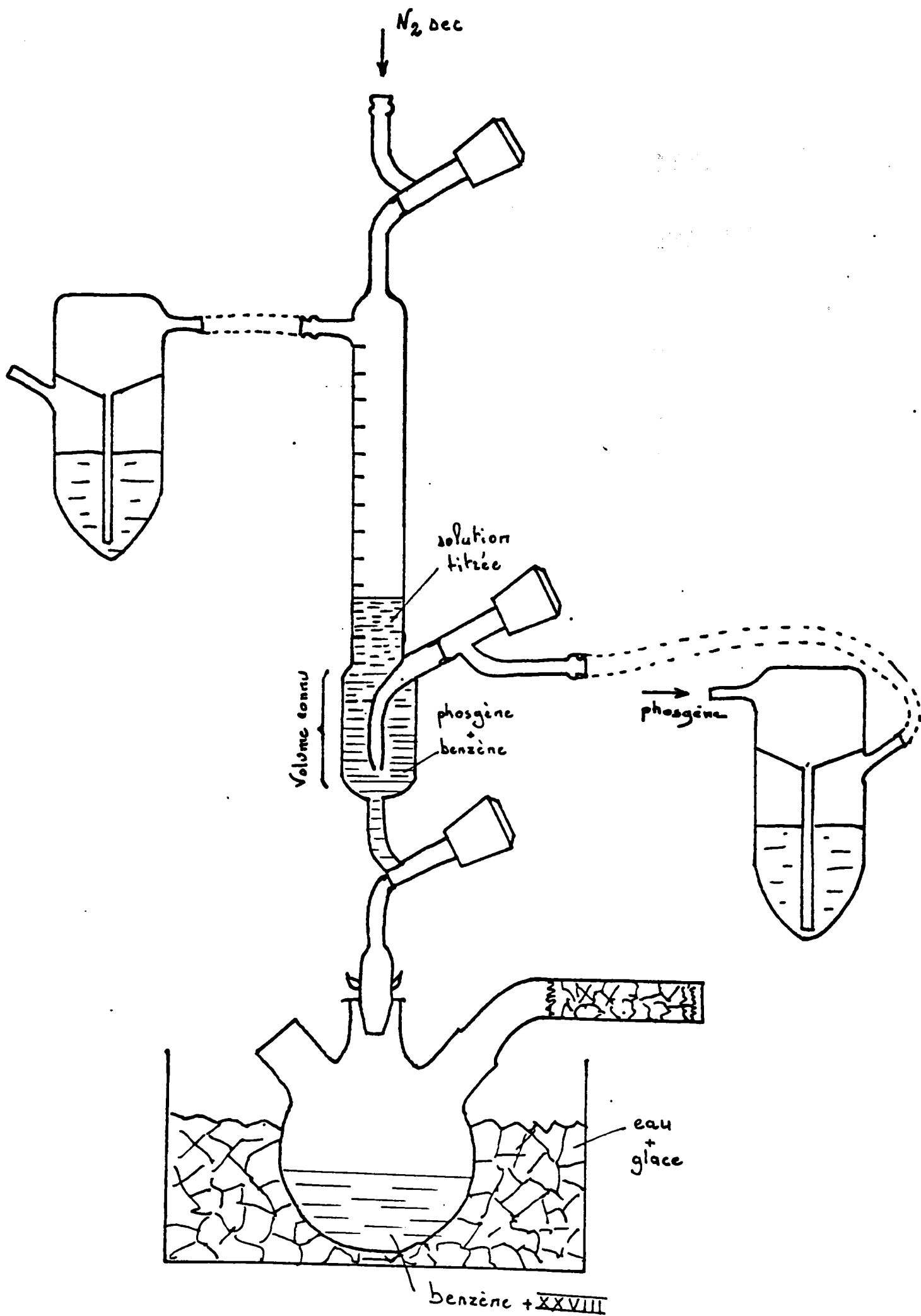
Nous donnons le détail de l'appareil que nous avons conçu pour obtenir une solution titrée de phosgène dans le benzène, et effectuer la réaction sans avoir de contact avec l'atmosphère extérieure.

Le phosgène provenant d'une bombe "Matheson" barbotte dans du benzène contenu dans une ampoule de volume connu surmontée d'un tube gradué. L'augmentation de volume de la solution peut ainsi être suivie. La solution obtenue est ensuite directement introduite dans le ballon contenant le sel de méthyl-pyridinium.

Le pyrophosphate obtenu sous forme de très beaux cristaux s'est avéré stable pendant plusieurs mois, gardé stable à température ambiante, en boîte à gants, à l'abri de la lumière.

2 - Conditions générales de la réaction

Sous protection d'une barrière à azote, dissoudre dans un ballon de 10 ml, 0,2 mMole (55 mg de pyrophosphate XX) dans 1 ml de chlorure de méthylène anhydre.



Montage utilisé pour transformer le sel de méthyl pyridinium (XXVIII) en pyrophosphate (XX) par action du phosgène.

Après avoir abaissé la température à 0°C à l'aide d'un bain eau / glace, ajouter à la seringue, très lentement, 0,18 mMole (0,09 mCi) de dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol (fraîchement préparé) et 0,2 mMole de γ collidine dissous dans 1 ml de chlorure de méthylène anhydre.

La formation de l'intermédiaire CEP OR₁ (XXI) est suivie par l'enregistrement de la radioactivité correspondant au dérivé hydrolysé (XXII) dans le mélange réactionnel chromatographié sur C.C.M. (chloroforme, méthanol 10 %) (R.F. = 0,2).

Après 1 h 30 à 0°C et 1 h 30 à 25°C, le rendement de formation de CEP OR₁ atteint 65 % (reproductible) par rapport à la totalité de la radioactivité (dipalmitine) initiale.

Toujours sous protection de la barrière d'azote, refroidir la solution à 0°C.

Rajouter alors à la seringue le deuxième alcool protégé (0,2 mM) dissous dans 1 ml de chlorure de méthylène anhydre.

La température est alors laissée remonter, la réaction se poursuivant, sous agitation, à température ambiante, durant 16 heures.

La réaction est arrêtée par addition d'eau ; rajouter quelques ml de CH₂Cl₂ et laver la phase organique (H₂O). Après séchage et évaporation, la phase organique est fractionnée par chromatographie sur plaque préparative développée par les solvants appropriés.

REMARQUE

La structure du composé intermédiaire (XXI) a été prouvée par l'étude du spectre de R.M.N. du produit XXVI provenant de l'hydrolyse de XXI, isolé par chromatographie sur plaque préparative éluée par le mélange chloroforme à 12 % de méthanol.

L'acide phosphatidique acétoïnyle (XXVI) se présente sous forme de beaux cristaux blancs insolubles dans l'acétone (recristallisés dans le mélange chloroforme / acétone). Le point de fusion est de 76°C.

Sur C.C.M. (CHCl_3 20 % MeOH) le R.F. est 0,35.

- R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$)

1 massif	1 H	5,2 ppm	H du squelette glycérol
1 massif	5 H	4,3 ppm	CH_2 positions 1 et 3 du glycérol H de l'acétoïnyle
1 massif	7 H	2,3 ppm	Méthyle en α du CO de l'acétoïnyle et 2 CH_2 en α du CO des acides gras
1 singulet élargi	55 H	1,3 ppm	Méthylène de la chaîne des acides gras Méthyle de l'acétoïnyle
1 massif	6 H	0,9 ppm	2 méthyles des acides gras

3 - Sn-phosphatidyl-éthanolamine (0,5 mCi/mMole)

a) Phosphatidyl-éthanolamine acétoïnylée et N-tritylée (XXIII)

Après condensation de trityl-éthanolamine (R_2OH) suivant le protocole expérimental décrit, la phase organique lavée et séchée est fractionnée par chromatographie sur plaque préparative (chloroforme, acétate d'éthyle 5 % en présence de T.E.A. 1 %).

La fraction (R.F. = 0,4), 60 % de la radioactivité, visible en U.V., positive à la ninhydrine et au réactif de Dittmer est recueillie.

Le rendement en activité récupérée est de 37 % par rapport à la dipalmitine.

Le produit ainsi isolé (XXIII) ne présente sur C.C.M. dans différents solvants (CHCl_3 , acétate d'éthyle) qu'une seule tâche.

- R.M.N.

1 massif	15 H	7,4 ppm	Protons aromatiques
1 massif	1 H	5,3 ppm	H du squelette glycérol
1 massif	7 H	4,2 ppm	CH_2 du glycérol (C_1 et C_3) $\text{P-OCH}_2\text{-CH}_2$ H de l'acétoïne
1 massif	7 H	2,3 ppm	2 CH_2 en α du CO de l'acide gras CH_2 en α de l'N CH_3 en α du CO de l'acétoïne
1 singulet déformé	55 H	1,3 ppm	CH_2 de la chaîne des acides gras et méthyle de l'acétoïne
1 massif	6 H	0,9 ppm	2 méthyles des acides gras

b) Hydrolyse des groupes protecteurs : obtention de P.E.

La déprotection de XXIII est effectuée en deux temps :

. Enlèvement du groupe acétoïne . A 0,1 mMole ($55 \mu\text{Ci}$) du dérivé acétoïnyle et tritylé de la P.E. (XXIII) dissous dans 1 ml de CH_2Cl_2 , rajouter 2 ml de pyridine, 2 ml d'eau et 0,2 mMole ($29 \mu\text{l}$) de triéthylamine.

Après 12 heures de chauffage à 70°C la réaction est arrêtée, la pyridine et l'eau sont enlevées par évaporation successives.

. La détritylation est effectuée sur le résidu d'évaporation par chauffage 3 minutes au reflux d'une solution d'acide acétique / eau : 9 / 1 (9 ml).

Après une journée à 20°C rajouter de l'acétone et laisser le mélange une nuit à - 20°C.

Le précipité formé est filtré sur Millipore et récupéré (51 μ Ci). Il est analysé par C.C.M. dans les solvants $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{AcOH} / \text{H}_2\text{O} : 65 / 25 / 0 / 4$ et $80 / 40 / 5 / 7$, en présence de P.E. témoins (inactive ou active préparée par d'autres méthodes).

L'enregistrement de la radioactivité des C.C.M. montre que la P.E. s'est formée avec un rendement de 33 % par rapport à la P.E. bi-protégée.

REMARQUE

Nous avons essayé d'effectuer de la même façon la condensation sur XX d'abord de N-trityl-éthanolamine puis de dipalmitoyl-glycérol. Les rendements obtenus sont nettement inférieurs. Cela doit être dû à l'encombrement stérique qui limite la réactivité de l'hydroxyle du dipalmitoyl-glycérol sur le triester cyclique.

4 - Sn-phosphatidyl D, L-glycérol (0,5 mCi/mMole)

a) Condensation du glycérol : préparation de l'acétoïnyl-P.G. (D, L)

Après avoir ajouté au mélange réactionnel 0,2 mMole de glycérol fraîchement distillé et laissé la réaction se produire une nuit à température ambiante, une C.C.M. (CHCl_3 , MeOH 8 %) montre la disparition presque totale (moins de 10 % de l'activité totale) du CEP OR_1 (XXI) (R.F. = 0,2) et l'apparition d'un produit actif phosphoré (R.F. = 0,4) représentant 47 % de l'activité totale.

Ce produit XXIV est isolé par chromatographie sur plaque préparative dans le même solvant (rendement 40 % par rapport au dipalmitoyl-glycérol).

Le spectre de R.M.N. confirme la structure ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$).

- R.M.N.

1 massif	1 H	3,3 ppm	H du squelette glycérol (C ₂)
1 massif	7 H	4,4 ppm	3 CH ₂ (C ₁ , C ₃ , P-OCH ₂ -C) 1 H de l'acétoïne
1 massif	3 H	3,8 ppm	H du squelette glycérol 1 CH ₂ (CH ₂ OH)
1 massif	7 H	2,3 ppm	CH ₃ en α du CO de l'acétoïne 2 CH ₂ en α du CO des acides gras
1 singulet élargi	55 H	1,3 ppm	CH ₃ de l'acétoïne CH ₂ de la chaîne des acides gras
1 massif	6 H	0,9 ppm	2 CH ₃ des acides gras

b) Déprotection

L'hydrolyse par la T.E.A. est effectuée sur XXIV ; après acidification, le mélange réactionnel est chromatographié sur couche mince dans les solvants (CHCl₃ / MeOH / AcOH / H₂O : 80 / 40 / 5 / 7 et 65 / 25 / 0 / 5) en présence de P.G. témoin.

L'enregistrement de la radioactivité des C.C.M. indique que le P.G. s'est formé avec un rendement de 37 % par rapport au P.G. acétoïnylé (XXIV) (R.F. = 0,8 et R.F. = 0,2).

5 - Sn-phosphatidyl-1 sn-glycérol (P.G.) 0,5 mCi/mMole

a) Sn-phosphatidyl-glycérol acétoïnylé et benzylé XXV

D'une façon tout à fait analogue, le benzyl-3 sn-glycérol est condensé sur XXI.

Le dérivé XXV (60 % de l'activité) est isolé par chromatographie sur plaque préparative (CHCl_3 , MeOH 1,5 %) (R.F. = 0,7) avec un rendement de 45 %.

La structure du P.G. bi-protégé XXV est confirmée par l'étude du spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$).

- R.M.N.

Singulet	5 H	7,4 ppm	Protons benzéniques
Massif	1 H	5,3 ppm	H du squelette glycérol (C_2)
Singulet	2 H	4,7 ppm	CH_2 benzylique
Massif	7 H	4,3 ppm	CH_2 (C_1 , C_3 , $\text{P-OCH}_2-\underset{\text{O-}}{\underset{ }{\text{CH}}}$) et H du groupe acétoïne
Massif	5 H	3,7 ppm	CH_2OCH_2 , H du benzylglycérol
Massif	7 H	2,3 ppm	2 CH_2 en α du CO 1 CH_2 en α du CO de l'acétoïne
Singulet élargi	55 H	1,3 ppm	CH_2 de la chaîne des acides gras CH_3 du groupe acétoïne
Massif	6 H	0,9 ppm	Méthyles des acides gras

b) Déprotection du benzyl-acétoïne-phosphatidyl-glycérol XXV

. La débenzylation catalytique effectuée durant une nuit dans le mélange $\text{CHCl}_2 / \text{EtOH}$ par hydrogénolyse sur charbon palladié 10 % conduit au dérivé XXIV identique à celui synthétisé par condensation directe du glycérol sur XXI. Filtrer sur Millipore 5 Å, laver le catalyseur et évaporer la solution.

. L'hydrolyse (T.E.A.) est effectuée sur le dérivé XXIV non isolé.

Après évaporation, les C.C.M. du mélange réactionnel acidifié, effectuées en présence de P.G. témoin dans les solvants $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{AcOH} / \text{H}_2\text{O}$: 80 / 40 / 5 / 7 et 65 / 25 / 0 / 4, (R.F. = 0,8 et R.F. = 0,2) indiquent que le P.G. s'est formé avec un rendement de 45 % par rapport au P.G. acétoïnulé et benzylé (XXV).

CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce travail nous avons montré qu'il était possible, par modification et adaptation des méthodes classiques de la chimie des phospholipides et glycérides, de préparer des dérivés marqués spécifiquement au carbone 14, ce, en vue d'études biochimiques et biologiques.

Des exemples de synthèse de composés appartenant aux différentes classes de glycérides (mono et di) et de phospholipides (phosphatidyl-éthanolamine, choline et sérine) ont été décrits.

Les produits formés, dont l'activité spécifique s'échelonne entre 0,5 mCi/mMole et 20 mCi/mMole, ont une très grande pureté chimique et radiochimique. Leur configuration est celle des dérivés naturels.

Dans la deuxième partie, nous avons mis au point, en utilisant des composés marqués, une méthode originale pour effectuer la synthèse de phospholipides.

Cette voie de synthèse s'est avérée très prometteuse et aura, sans nul doute, grâce à la simplicité de sa mise en oeuvre, un très grand avenir dans le domaine de la synthèse des différentes classes de phospholipides complexes.

BIBLIOGRAPHIE

- / 1 / HIRSCHMANN H.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 2762.
- / 2 / IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature
J. Lipid Res., 1967, 8, 523.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 1.
- / 3 / Analysis of Triglycérides.
Carter Litchfield, Academic Press, 1972, New York and London.
- / 4 / E. BAER et H.O.L. FISHER
J. Biol. Chem., 1939, 128, 463.
- / 5 / E. BAER et H.O.L. FISHER
J. Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 761.
- / 6 / Biochemical Preparations, 1952, 2, 32.
- / 7 / J. LECOCQ et C.E. BALLOU
Biochemistry, 1964, 3, 976.
- / 8 / G.S. GHANGAS et T.P. FONDY
Biochemistry, 1971, 10, 3204.

- / 9 / E. FISHER et C. RUND
Ber., 1916, 49, 91.
- / 10 / E. BAER
J. Amer. Chem. Soc. (1945), 67, 338.
- / 11 / G. KOHAN et G. JUST
Synthesis, 1974, 192.
- / 12 / E. BAER, J.M. GROSHEINTZ et H.O.L. FISHER
J. of Amer. Chem. Soc., 1939, 61, 2607.
- / 13 / J.C. SOWDEN et H.O.L. FISHER
J. Amer. Chem. Soc., 1941, 63, 3244.
- / 14 / L. HARTMAN
J. Chem. Soc., 1959, 4134.
- / 15 / E. BAER, H.O.L. FISHER
J. Amer. Chem. Soc., 1945, 67, 2031.
- / 16 / A.P. DOERSHUK
J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 4202.
- / 17 / J.C. SOWDEN et H.O.L. FISHER
J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 1963.
- / 18 / P. VERKADE
Bull. Soc. Chim. France, 1963, 1993.
- / 19 / G.H. DE HAAS
Glycérophosphatides, their chemical Synthesis and Application in Lipid
Biochemistry, Utrecht, 1963.

- / 20 / L. VAN DEENEN and G.H. DE HAAS
Adv. Lipid Res., 1964, 2, 167.
- / 21 / E. BAER
J. Amer. Oil Chem. Soc., 1965, 42, 257.
- / 22 / L. VAN DEENEN and G.H. DE HAAS
Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 157.
- / 23 / L.D. BERGEL'SON
Uspekhi Sovrem. Biol., 1967, 64, 355.
- / 24 / E. BAER
Trans. Roy. Soc. Canada, 1967, 20, 231.
- / 25 / P. VERKADE
Farmaco Ed. Scient., 1968, 23, 149.
- / 26 / B.A. KLYASHCHITSKII et col.
Uspekhi Khim, 1969, 38, 740.
(Russ. Chem. Rev., 1969, n° 4).
- / 27 / A.J. SLOTBOOM et P.P.M. BONSEN
Chem. Phys. Lipids, 1970, 5, 301.
- / 28 / R.H. GIGG
Rodd's Chemistry, 2ème édit., Vol. 1, Chapitre 21.
- / 29 / A.F. ROSENTHAL
Methods in Enzymology, Vol. 44, p. 429.

- / 30 / V.I. SHVETS
Russ. Chem. Rev., 1971, 40 (4), 330.
- / 31 / L. HESSEL, L. MORTON, A. TODD et P. VERKADE
Rec. Trav. Chim., 1954, 73, 150.
- / 32 / T. BEVAN, T. MALKIN et J. TIPLADY
J. Chem. Soc., 1957, 3086.
- / 33 / T. BAYLIS, T. BEVAN et T. MALKIN
J. Chem. Soc., 1958, 2962.
- / 34 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1961, 80, 951.
- / 35 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1962, 81, 215.
- / 36 / R. BIRD et J. CHADHA
Tetrahedron Letters, 1966, 4541.
- / 37 / E. BAER, Y. SURUKI, J. BLACKWELL
Biochem., 1963, 2, 1227.
- / 38 / FRENDEMBERG et HESS
Ann. Chem., 1926, 448, 126.
- / 39 / L. SERVAS et I. DILARIS
J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 5354.
- / 40 / J.W. GIELKENS et coll.
Rec. Trav. Chim., 1958, 77, 663.

- / 41 / J.S. CHADHA
Chem. Phys. Lipids, 1968, 2, 415.
- / 42 / J.D. BILLIMONA et K.O. LEWIS
J. Chem. Soc., 1968, C, 1407.
- / 43 / T. BEVAN, D. BROWN, G. GREGORY et T. MALKIN
J. Chem. Soc., 1953, 127.
- / 44 / J. GIELKENS et coll.
Rec. Trav. Chim., 1958, 77, 656.
- / 45 / N. STANACEV et M. KATES
Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, 38, 297.
- / 46 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1961, 80, 1951.
- / 47 / M. HOEFNAGEL, L. STEGERHOCK et P. VERKADE
Rec. Trav. Chim., 1960, 79, 336.
- / 48 / M. HOEFNAGEL, L. STEGERHOCK et P. VERKADE
Rec. Trav. Chim., 1960, 79, 605.
- / 49 / A. VEEN et P. VERKADE
Rev. Trav. Chim., 1960, 79, 1085.
- / 50 / E. BAER et S. PAVANARAM
J. Biol. Chem., 1961, 236, 2410.

- / 51 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Tetrahedron Letters, 1960, 9, 1.
- / 52 / P. BIRD, G.H. DE HAAS, C. HEENSKERCK et L. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 566.
- / 53 / A.J. SLOTBOOM, G.H. DE HAAS et L.L.M. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1963, 82, 469.
- / 54 / V.M. POLYACHENKO, G.I. SAMOKHVALOV et N.A. PREOBRAZHENSKII
Zhur. Obshch. Khim., 1962, 32, 396.
- / 55 / G.H. DE HAAS, F. DAEMEN et L. VAN DEENEN
Biochem. Biophys. Acta, 1962, 65, 260.
- / 56 / F. DAEMEN, G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1962, 81, 348.
- / 57 / F. DAEMEN, G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN H.
Rec. Trav. Chim., 1963, 82, 487.
- / 58 / J. MAURUKAS, S. KAIRYS et C. HOLLAND
Biochemistry, 1963, 2, 397.
- / 59 / G.H. DE HAAS, H. LUTPHEN, P. BONSEN et L. VAN DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1964, 83, 99.
- / 60 / Y. LAPIDOT, I. BARZILAY et J. HAJDU
Chem. Phys. Lipids, 1969, 3, 125.

- / 61 / Y. LAPIDOT et Z. SELINGER
J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 5522.
- / 62 / T. NEILSON et E.S. WERSTIUK
Can. J. Chem., 1971, 49, 493.
- / 63 / H.A. STAAB
Chem. Ber., 1957, 90, 1326.
- / 64 / A.A. KRAEVSKII et coll.
Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Serya Khimicheskaya, 1971, 9, 2028.
- / 65 / P.P.M. BONSEN et G.H. DE HAAS
Chem. Phys. Lipids, 1967, 1, 100.
- / 66 / H. GOLDWIT et B.C. SAUNDERS
J. Chem. Soc., 1957, 2409.
- / 67 / S. RAKKIT, J.F. BAGLI et R. DEGHEGHI
Can. J. Chem., 1969, 47, 2906.
- / 68 / I. BARZILAY et Y. LAPIDOT
Chem. Phys. Lipids, 1969, 3, 280.
- / 69 / R. ANEJA, J.S. CHADHA, P. DAVIES
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 218, 102.
- / 70 / P.F. BUTSKUS
Zh. Org. Khimii, Vol. 6, n° 10, 1984.
- / 72 / R. ANEJA et J.S. CHADHA
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 248, 455.

- / 73 / E. BAER et M. KATES
J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 942.
- / 74 / D. HANAHAN
J. Biol. Chem., 1954, 207, 879.
- / 75 / N. TATTRIE et M.C. ARTHUR
Canad. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 1165.
- / 76 / E. BAER et D. BUCHNEA
J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 232.
- / 77 / E. BAER et D. BUCHNEA
Canad. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 953.
- / 78 / F. KÖGL, G. HAAS et L. DEENEN
Rec. Trav. Chim., 1960, 79, 661.
- / 79 / D. HANAHAN et H. BROCKERHOFF
Arch. Biochem. Biophys., 1960, 91, 326.
- / 80 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Tetrahedron Letters, 1960, 22, 7.
- / 81 / G.H. DE HAAS et L. VAN DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 469.
- / 82 / N. TATTRIE et J. BENNETT
Canad. J. Biochim. Physiol., 1963, 41, 1983.

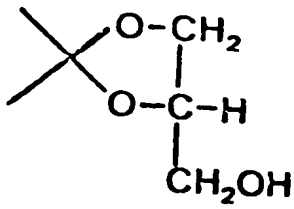
- / 83 / V.I. SHVETS, L. ANTAL, L.V. VOLKOVA et N.A. PREOBRAZHENSKII
Zhur. Obshch. Khim., 1964, 34, 1908.
- / 84 / A. BRANDT et N. LANDS
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 144, 605.
- / 85 / H. BOSH, L. GOLDIE, A. SLOTBOOM et L. DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 694.
- / 86 / H. BOSH, A. SLOTBOOM et L. DEENEN
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 176, 632.
- / 87 / E. BAER et J. BLACKWELL
Biochemistry, 1964, 3, 975.
- / 88 / L.M. BOVA, V.I. SHVETS, F. Ya. SHUTOYA et N.A. PREOBRAZHENSKII
Zhur. Org. Khim., 1965, 1, 1720.
- / 89 / V.I. SHVETS, V.A. KLOPOVA et N.A. PREOBRAZHENSKII
Khim. Purod Soed., 1966, 80.
- / 90 / F. BAER, Y. SUSUKI, J. BLACKWELL
Biochem., 1963, 2, 1227.
- / 91 / R. ANEJA, J.S. CHADHA et J.A. KNAGGS
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 579.
- / 92 / R. ANEJA, J.S. CHADHA, E. CUBERO ROBLES, R. VAN DAAL
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 439.

- / 93 / H. BROCKERHOFF et M. YURKOWSKI
Can. J. Biochem., 1965, 43, 1777.
- / 94 / R. ANEJA et coll.
Chem. Phys. Lipids, 1969, 3, 286.
- / 95 / J.F. ARENS et H.C. VOLGER
Rec. Trav. Chim., 1958, 77, 1170.
- / 96 / H.H. WASSERMAN et P.S. WHARTON
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 661.
- / 97 / H. WASSERMAN et D. COHEN
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4435.
- / 98 / R.B. WOODWARD et R.A. OLOFSON
J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1007.
- / 99 / R.B. WOODWARD, R.A. OLOFSON et H. MAYER
J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1010.
- / 100 / M. ZAORAL et Z. ARNOLD
Tetrahedron Letters, 1960, 14, 9.
- / 101 / H.H. BOSCHARD, R. MORY, M. SCHMID et H. ZOLLINGER
Helv. Chim. Acta, 1959, 42, 1653.
- / 102 / K. LANGELD
Ber., 1910, 43, 1857.

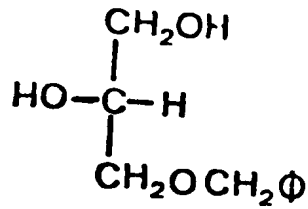
- / 103 / G. SCHRAMM, H. GROTSCH et W. POLLMANN
Angew. Chem., 1962, 74, 53.
- / 104 / F. CRAMER et G. WEIMANN
Ber., 1961, 94, 996.
- / 105 / H. SCHALLER, H.A. STAAB et F. CRAMER
J. Am. Chem. Soc., 1961, 94, 1621.
- / 106 / H.G. KHORANA, J.P. VIZSOLYI et R.K. RALPH
J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 414.
- / 107 / H.G. KHORANA, G.M. TENER, J.G. MOFFAT et E.H. POL
Chem. Ind. (London), 1956, 1523.
- / 108 / G.M. TENER, H.G. KHORANA, R. MARKHAM et E.H. POL
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 6224.
- / 109 / T.M. JACOB et H.G. KHORANA
J. Am. Chem. Soc., 86, 1630.
- / 110 / G. WEIMANN et H.G. KHORANA
J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 4329.
- / 111 / F. CRAMER, R. WITMANN, K. DANECK et G. WEIMANN
Angew. Chim., 1963, 75, 92.
- / 112 / R. BURGADA et D. BERNARD
L'Actualité Chimique, Sept. 1975, 7.
- / 113 / R. BURGADA et D. BERNARD
L'Actualité Chimique, Oct. 1975, 8.

- / 114 / F. RAMIREZ
Acc. Chem. Res., 1968, 1, 168.
- / 115 / F. RAMIREZ
Pure and applied Chemistry, 1964, 9, 337
- / 116 / F. RAMIREZ
Bull. Soc. Chim., 1966, 2443.
- / 117 / F. RAMIREZ
Synthesis, 1974, 90.
- / 118 / F. RAMIREZ, J.F. MARECEK, I. UGI
J. Am. Chem. Soc., 1975, 13, 3809.
- / 119 / F. RAMIREZ, J.F. MARECEK, I. UGI
Synthesis, 1975, n° 2, 99.
- / 120 / F. RAMIREZ, B. HANSEN, N.B. DESAI
J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 4588.
- / 121 / F. RAMIREZ, P.V. IOANNOU, J.F. MARECEK, M. NOWAKOWSKI,
B.T. GOLDING, G.H. DODD
Synthesis, 1976, 483.
- / 122 / F. RAMIREZ, H. OKAZAKI, J.F. MARECEK
Synthesis, 1975, 637.
- / 123 / F. RAMIREZ, J.F. MARECEK, H. OKAZAKI
J. Am. Chem. Soc., 1976, 5310.

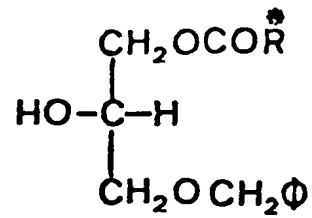
- / 124 / J.L. DANAN et L. PICHAT
XII^e Journées Biochimiques Latines, Bordeaux, 31.5 au 4.6. 1976.
- / 125 / L. PICHAT
Le Service des Molécules Marquées. Extrait du B.I.S.T. n° 118
Sept. 1967.
- / 126 / L. PICHAT et Y. LANGOURIEUX
Informations Chimie, Octobre 1974, n° 136, 143.
- / 127 / J.C. DITTMER et R.L. LESTER
J. Lip. Res., 1964, 5, 126.
- / 128 / F. RAMIREZ, P.V. IOANNOU, J.F. MARECEK, B.T. GOLDING,
G.H. DODD
Synthesis, Novembre 1976, 769.
- / 129 / H. VORBRÜGGEN, K. KROLIKIEWICZ
Angew. Chem., 1975, 87 (24), 877.
Angew. Chem. Int. ed. Engl., 1975, 14, 818.
- / 130 / P.M. VIGNAIS, A. COLBEAU, F. CUAULT, H. NGO-TRI et
M. PILARSKA
Lipids, 1976, 1, 117.
- / 131 / P.M. VIGNAIS et coll.
Characterization of mono and triglyceride lipases and phospholipase A
in rat liver microsomes.
Publication en cours dans Biochim. Biophys. Acta.



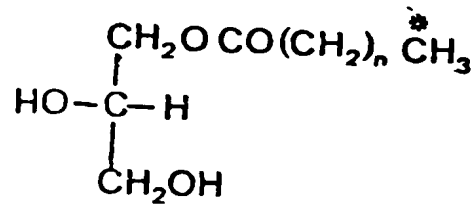
I



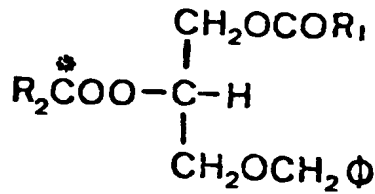
II



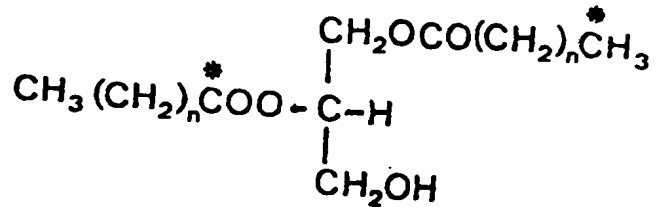
III



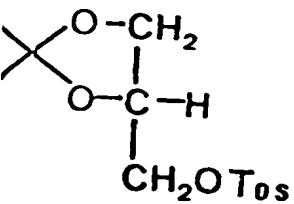
IV



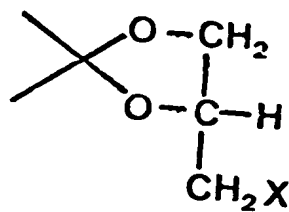
V



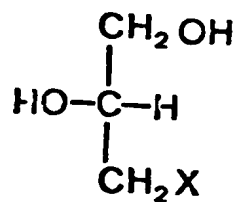
VI



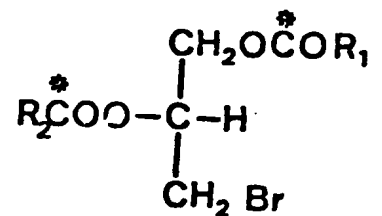
VII



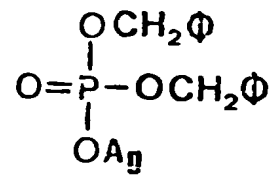
VIII



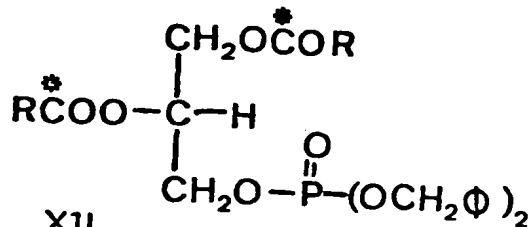
IX



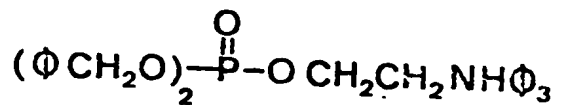
X



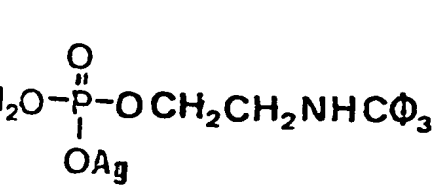
XI



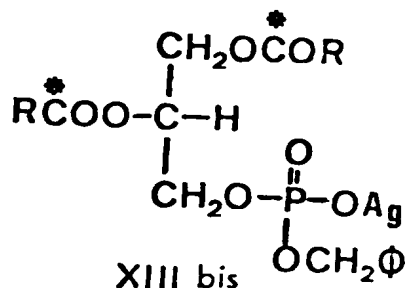
XII



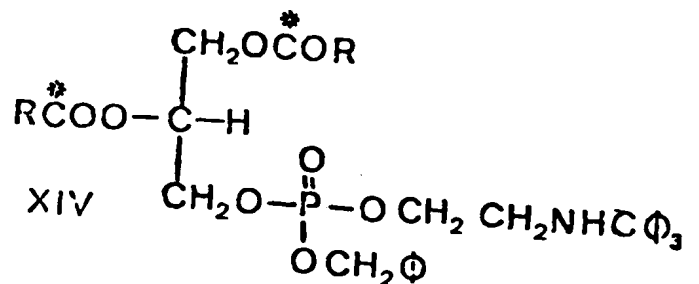
XII bis



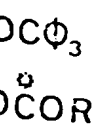
XIII



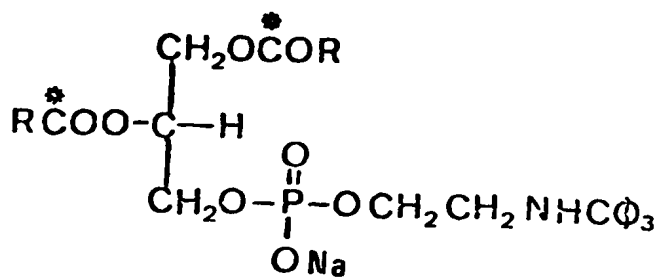
XIII bis



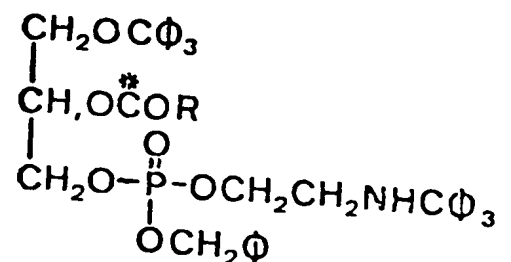
XIV



XV



XV bis



XVI

