

SYNTHÈSE DE PHOSPHOLIPIDES MARQUÉS AU CARBONE 14 A L'AIDE DU
"PYROPHOSPHATE D'ENEDIOL CYCLIQUE"

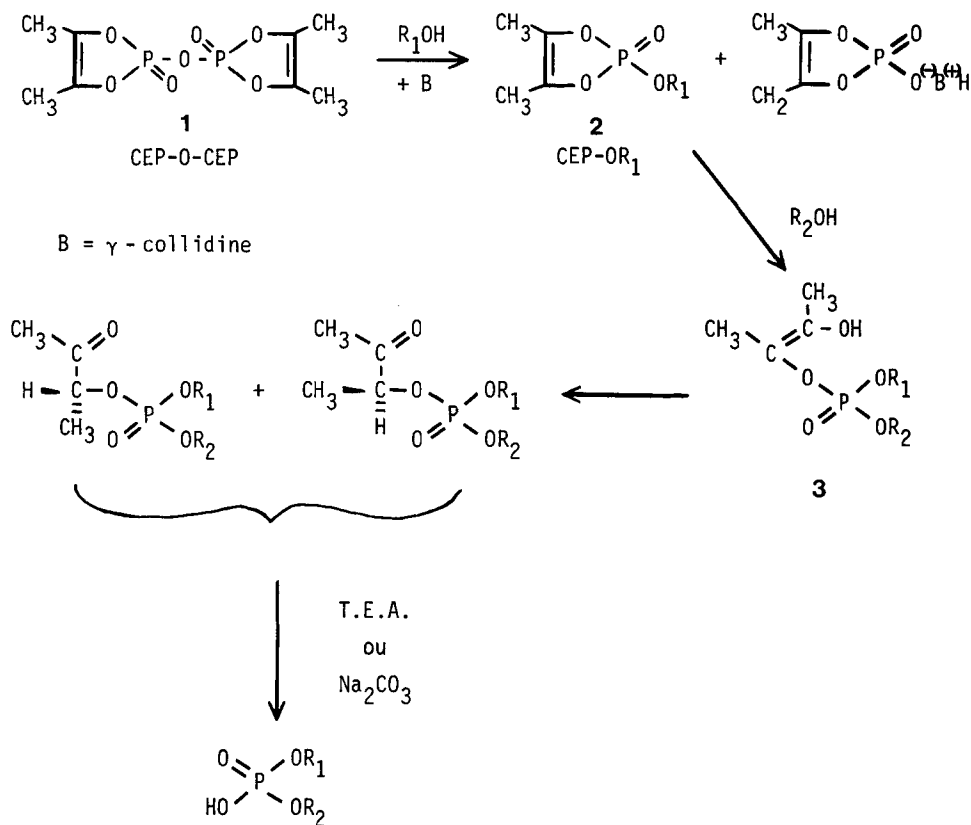
J.-L. DANAN et L. PICHAT

Service des Molécules Marquées - C.E.N.-SACLAY
B.P. No 2 - F 91190 GIF SUR YVETTE (FRANCE)ABSTRACT

¹⁴C labelled phospholipid synthesis through the use of "cyclic enediolpyrophosphate".

Ramirez's pyrophosphate 1 was used in a one pot convenient synthesis of a few [¹⁴C]-acyl phospholipids. Reagent 1 was condensed with 1,2-[1-¹⁴C] dipalmitoyl Sn-glycerol to the cyclic triester phosphate 4 which without isolation, was reacted with N-tritylethanolamine, 3-O-benzyl Sn-glycerol and glycerol leading to intermediates 5, 6, 7 which were deprotected by triethylamine hydrolysis and other appropriate treatments.

Le "pyrophosphate d'enediol cyclique" 1 (CEP-O-CEP) récemment introduit en synthèse organique par F. Ramirez (1,2) permet la préparation de diesters mixtes phosphoriques selon le schéma 1. Mis en présence d'un alcool R₁OH 1 forme CEP-OR₁ 2 lequel réagissant avec un autre alcool primaire R₂OH conduit au triester phosphorique 3. Ce dernier peut être hydrolysé sélectivement (3) par traitement basique (triéthylamine ou carbonate de sodium), la liaison acétoñyle/phosphore étant plus labile que les autres liaisons esters.



SCHEMA 1

Nous avons appliqué ce procédé à la synthèse de phospholipides marqués au carbone 14 sur les fonctions acyles, selon le schéma 2. Le pyrophosphate 1 et le dipalmitoyl (^{14}C -1)-1,2 Sn-glycérol (4,5,6) donnent le triester phosphorique cyclique 4, que l'on n'isole pas, et qui est condensé sur la fonction alcool primaire de la N-trityléthanolamine ou du benzyl-3 Sn-glycérol avec formation des intermédiaires 5 et 6 avec des rendements respectifs de 37 et 45 %. Le composé 5 est traité successivement par la triéthylamine pour éliminer le groupe acétoïne, puis en milieu acide acétique 90 % pour éliminer le groupe N-trityle afin d'obtenir la Sn-phosphatidyl éthanolamine (P.E.) avec un rendement de 33 % par rapport à 5. Le composé 6 est hydrogénéolysé puis traité par la triéthylamine pour conduire au Sn-phosphatidyl glycérol (P.G.) de configuration naturelle avec un rendement de 31 % par rapport à 6.

Dans des essais préliminaires effectués avec le dipalmitoyl ^{14}C -1,2 benzyl-3 Sn-glycérol, nous avons contrôlé que les fonctions ester d'acide gras ne sont pas hydrolysées dans les conditions nécessaires à l'élimination du groupe acétoïnyle (triéthylamine - 12 h - 70° C ou carbonate de soude - 6 h - 60° C). Des résultats identiques ont été rapportés par F. Ramirez (7) lors d'une synthèse de cardioline.

Le triester phosphorique cyclique **4** condensé avec le glycérol a conduit à un analogue du phosphatidyl glycérol avec un rendement global de 12 % par rapport au dipalmitoylglycérol.

Dans la synthèse du phosphatidylglycérol (PG) le O-benzyl-3 Sn-glycérol ne peut être remplacé par l'O-acétyl-3 Sn-glycérol. Bien que les groupes acétyle et acétoïnyle de l'intermédiaire soient hydrolysés par la triéthylamine, nous n'avons pas pu isoler de phosphatidyl glycérol.

L'ester phosphorique cyclique **4** hydrolysé par l'eau a donné l'acide phosphatidique acétoïnylé **8**, qui n'a pu comme attendu être hydrolysé par traitement à la triéthylamine. L'acide phosphatidique libre n'a donc pas pu être obtenu.

Bien que nous n'ayons utilisé la méthode de Ramirez que pour un nombre très limité de synthèses de phospholipides de très faibles activités spécifiques, il est évident que ce procédé et ses développements récents (10,11) sont applicables à la préparation rapide et facile de phospholipides marqués par les isotopes radioactifs ou stables.

Remerciements

Nous tenons à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur S. DAVID - Laboratoire de Chimie des Composés Polyfonctionnels - Université Paris XI ORSAY, pour ses suggestions et son intérêt pour le présent travail.

+ + + + + + + +

PARTIE EXPERIMENTALE

* Le dichlorométhane est séché sur anhydride phosphorique puis distillé.

* Les chromatographies sur plaques de gel de silice Merck 60 F 254 ont été révélées par la ninhydrine (composés azotés) ou par le réactif de Dittmer (8) pour les dérivés organiques du phosphore.

* Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés, en solution dans le chloroforme deutérié, sur appareil Jeol C 60 HL à 60 MHz (référence TMS).

PYROPHOSPHATE D'ENEDIOLCYCLIQUE 1

Préparé selon (1). Toutes les manipulations ont été conduites à l'abri de l'humidité, les filtrations étant faites en boîte à gants sous courant d'azote. **1**, conservé en boîte à gants, à l'abri de la lumière est stable pendant plusieurs mois à la température ambiante.

Mode opératoire général :

Sous protection d'une barrière d'azote, on prépare une solution de 55 mg de pyrophosphate **1** (0,2 mMole) dans 1 mL de dichlorométhane anhydre. On refroidit à 0° C et y ajoute 0,18 mMole (0,09 mCi) de dipalmitoyl (¹⁴C-1)-1,2 Sn-glycérol et 0,2 mMole de γ -collidine en solution dans 1 mL de dichlorométhane anhydre.

La formation de **4** est suivie par radiochromatographie du composé **8** provenant d'aliquotes du mélange réactionnel (plaques Merck 60 F 254 ; solvant : chloroforme méthanol 10 % ; R_F = 0,2)

Au bout de 1 h 30 à 0° C et 1 h 30 à 25° C, le rendement de **4** est de 65 %. La solution est ramenée à 0° C et on y ajoute à la seringue 0,2 mMole de N-tritylaminoéthanol ou de O-benzyl-3 glycérol. On laisse la réaction se poursuivre à la température ambiante pendant 16 heures. La réaction est arrêtée par addition d'eau. Après addition de quelques millilitres de dichlorométhane, la phase organique est lavée à l'eau, séchée, évaporée sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie préparative sur couche mince.

DIPALMITOYL PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE ACETOINYLEE ET N-TRITYLEE 5

Après condensation de la N-trityléthanolamine, le produit de réaction est purifié sur plaque Merck 60 F 254 avec développement par le solvant : CHCl₃, CH₃CO₂C₂H₅ 5 % + 1 % (C₂H₅)₃ N.

La bande de $R_F = 0,4$ (60 % de la radioactivité, visible sous lumière U.V., réagissant positivement à la ninhydrine et au réactif de Dittmer (8)), est isolée avec un rendement radioactif de 37 % par rapport à la dipalmitine.

R.M.N.

- $\delta = 7,4$ ppm (m-15H-aromatiques),
- $\delta = 5,3$ ppm (m-1H-H glycérol),
- $\delta = 4,2$ ppm (m-7H-CH₂ glycérol, POCH₂CH₂, H acétoïnyle),
- $\delta = 2,3$ ppm (m-7H-CH₂ en α du CO de l'acide, CH₂ en α de l'azote, CH₃ en α du CO de l'acétoïnyle),
- $\delta = 1,3$ ppm (m-55H-CH₂ acide gras, CH₃ acétoïnyle),
- $\delta = 0,9$ ppm (m-6H-CH₃)

DIPALMITOYL (¹⁴C-1) Sn-PHOSPHATIDYL-1 Sn-GLYCEROL ACETOINYLE ET O-BENZYLE 6

Après condensation de 0,2 mMoles de O-benzyl-3 Sn-glycérol sur 4, le produit de réaction 6 est isolé avec un rendement de 45 % par chromatographie préparative sur plaque Merck 60 F 254 (solvant CHCl₃, MeOH 1,5 % - $R_F = 0,7$).

R.M.N.

- $\delta = 7,4$ ppm (s-5H-aromatiques),
- $\delta = 5,3$ ppm (m-1H-CH glycérol),
- $\delta = 4,7$ ppm (s-2H-CH₂ benzylique),
- $\delta = 4,3$ ppm (m-7H-CH₂ 1 et 3 du glycérol, P-OCH₂-, H acétoïnyle)
- $\delta = 3,7$ ppm (m-5H-CH₂OCH₂ et H benzylglycérol)
- $\delta = 2,3$ ppm (m-7H-CH₂ α du CO et CH₂ du CO acétoïnyle)
- $\delta = 1,3$ ppm (m-55H, CH₂ acides gras et CH₃ acétoïnyle)
- $\delta = 0,9$ ppm (m-6H, CH₃)

DIPALMITOYL (¹⁴C) Sn-PHOSPHATIDYL-1 D,L-GLYCEROL ACETOINYLE

Préparé comme il a été dit par condensation de 0,2 mMole de glycérol, il est isolé avec un rendement de 40 % par rapport au dipalmitoyl glycérol par chromatographie préparative sur plaque Merck 60 F 254 (solvant : CHCl₃, CH₃OH : 8 % - $R_F = 0,4$).

R.M.N.

- $\delta = 3,3$ ppm (m-1H-CH glycérol)
- $\delta = 4,4$ ppm (m-7H-CH₂ 1 et 3 du glycérol, P-OCH₂, H acétoïnyle)
- $\delta = 3,8$ ppm (m-3H-H glycérol, CH₂(CH₂OH)
- $\delta = 2,3$ ppm (m-7H-CH₂ en α du CO de acétoïnyle, 2 CH₂ en α du CO des acides gras)
- $\delta = 1,3$ ppm (m-55H-CH₃ acétoïnyle, CH₂ acides gras)
- $\delta = 0,9$ ppm (m-6H-2 CH₃ acide gras)

DIPALMITOYL (¹⁴C)-1 PHOSPHATIDYL-ETHANOLAMINE (PE)

0,1 mMole (55 μ Ci) de composé 5 en solution dans 1 mL de pyridine, 2 mL d'eau et 0,2 mMole de triéthylamine sont chauffés pendant 12 heures à 70° C. Après évaporation sous vide, le résidu est repris par 9 mL d'un mélange eau/acide acétique : 9/1, et l'on chauffe au reflux pendant 3 mn. Le mélange est laissé à 20° C pendant 6 heures puis, après addition de 20 mL d'acétone conservé à - 20° C pendant 15 heures. Le précipité formé est filtré sur filtre "Teflon" "Millipore" (51 Ci). L'analyse radiochromatographique en CCM (solvant : CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O : 65/25/0/4 et 80/40/5/7) en présence d'échantillons témoins inactifs commerciaux ou marqués au ¹⁴C (5,9) indique un rendement de 33 % par rapport à 5.

DIPALMITOYL (¹⁴C-1) Sn-PHOSPHATIDYL-1 Sn-GLYCEROL (PG)

L'hydrolyse de 6 dans 2 mL de CH₂Cl₂/EtOH : 1/1 en présence de Pd/C à 10 % pendant 15 h conduit à 7 "Sn" que l'on hydrolyse par la triéthylamine dans les mêmes conditions que la PE après filtration du catalyseur sur filtre "Téflon" "Millipore".

L'analyse par CCM en présence d'un échantillon témoin commercial de PG indique un rendement de 31 % (solvants : CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O : 80/40/5/7 - R_F = 0.8 et 65/25/0/4 - R_F = 0,2).

DIPALMITOYL (¹⁴C-1) Sn-PHOSPHATIDYL D,L-GLYCEROL 9

Après hydrolyse de 7 (D,L) par la triéthylamine dans les mêmes conditions, le mélange réactionnel est analysé en CCM dans les mêmes systèmes de solvants. Cet analogue de PG migre aux mêmes R_F que le PG témoin commercial et que le PG synthétisé. Le rendement est de 37 %.

ACIDE DIPALMITOYL (¹⁴C-1) PHOSPHATIDIQUE ACETOINYLE 8

Le mélange réactionnel contenant l'intermédiaire 4 est hydrolysé par addition de quelques gouttes d'eau. La phase organique est analysée par CCM, solvant : CHCl₃/MeOH : 80/20. Il s'est formé un produit (R_F = 0,35) représentant 65 % de la radioactivité totale.

Afin d'en déterminer sa structure, une partie aliquote de mélange réactionnel est chromatographiée sur plaque préparative dans le même solvant. Le produit isolé est recristallisé dans un mélange CH₂Cl₂/CH₃COCH₃ son point de fusion est 76° C.

Le spectre de RMN confirme la structure du produit attendu.

R.M.N.

- $\delta = 5,2$ ppm (m-1H-H glycérol)
- $\delta = 4,3$ ppm (m-5H-CH₂ glycérol et H acétoïnyle)
- $\delta = 2,3$ ppm (m-7H-CH₂-CO acétoïnyle et CH₂COOR)
- $\delta = 1,3$ ppm (m-55H, CH₂ acides gras et CH₃ acétoïnyle)
- $\delta = 0,9$ ppm (m-6H-CH₃)

Ce produit s'est avéré comme attendu stable vis à vis de l'hydrolyse par la triéthylamine.

REFERENCES

- 1 - RAMIREZ F., MARECEK J.F. et UGI I. - J. Am. Chem. Soc. 13 : 3809 (1975)
- 2 - RAMIREZ F., MARECEK J.F. et UGI I. - Synthesis 2 : 99 (1975)
- 3 - RAMIREZ F., HANSEN B. et DESAI N.B. - J. Am. Chem. Soc. 84 : 4588 (1962)
- 4 - DANAN J.L. et PICHAT L. - "Synthèses de glycérides marqués au carbone 14" - J. of Labelled Compounds and Radiopharm. (sous presse)
- 5 - DANAN J.L. - Thèse de doctorat ès-Sciences : Université de Paris XI (ORSAY) - Mars 1977
- 6 - SOWDIN et FISCHER H.O.L. - J. Am. Chem. Soc. 63 : 3244 (1941)
- 7 - RAMIREZ F., IOANNOU P.V., MARECEK J.F., GOLDING B.T. et DODD G. H. - Synthesis 769 (1976)
- 8 - DITTMER J.C. et LESTER R.L. - J. Lip. Res. 5 : 126 (1964)
- 9 - DANAN J.L. et PICHAT L. - "Adaptation de méthodes classiques à la synthèse de phospholipides marqués au carbone 14" (en préparation)
- 10 - RAMIREZ F., OKAZAKI H., MARECEK J.F. - Synthesis 637 (1975)
- 11 - RAMIREZ F., MARECEK J.F., OKAZAKI H. - J. Am. Chem. Soc. 98 : 5310 (1976)