

ADAPTATION DE METHODES CLASSIQUES A LA SYNTHÈSE DE GLYCEROPHOSPHOLIPIDES MARQUÉS AU CARBONE 14

J.L. DANAN et L. PICHAT
Service des Molécules Marquées - CEN-SACLAY
BP N° 2 - 91190 GIF-SUR-YVETTE (FRANCE)

ABSTRACT

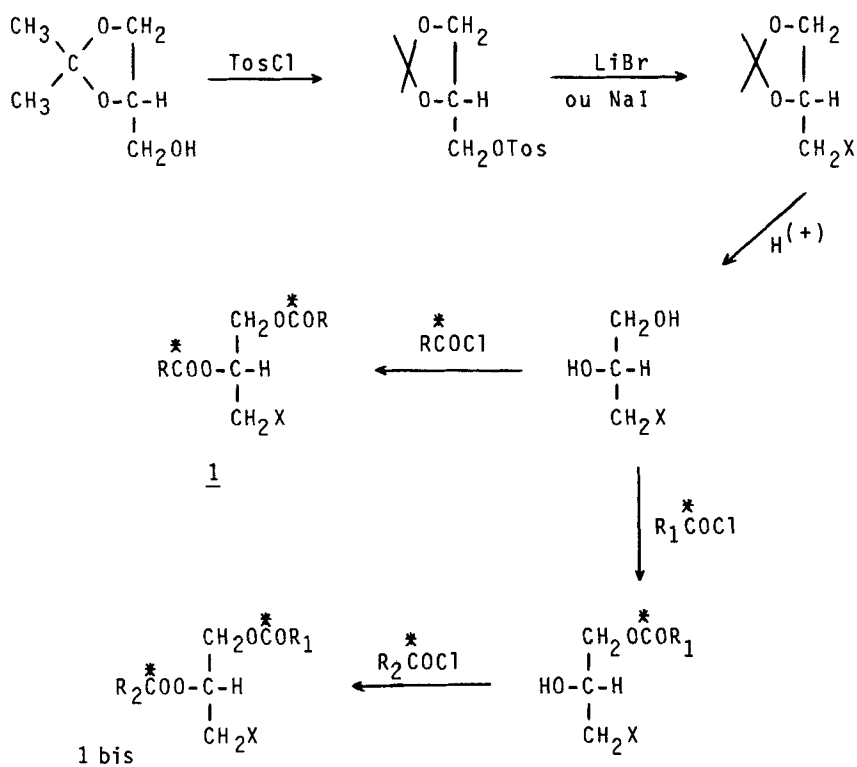
Classical phospholipids syntheses were selected and adapted to the preparation of natural glycerophospholipids labelled with carbon 14 in the acyl moiety. 1,2-(^{14}C) diacyl-3-bromo sn-glycerol was the starting material.

Saturated ^{14}C -phosphatidyl-ethanolamine, choline and serine were obtained in 30 %, 25 % and 11 % yields relative to the ^{14}C -fatty acid, by condensation of a suitably protected amino-alcohol with a (^{14}C -diacyl) phosphatidic acid in presence of triisopropyl-benzene-sulfonyl-chloride followed by deprotection of the amino group.

The synthesis of unsaturated (or mixed) ^{14}C phosphatidyl ethanolamine was achieved, with a 28 % yield, by condensation of the ^{14}C -diacyl-bromoglycerol with the silver salt of the N-trityl aminoethyl and benzyl diester of phosphoric acid and subsequent deprotections.

Nous avons expérimenté les méthodes de la littérature pour la synthèse de glycérophospholipides de configuration absolue naturelle, de composition chimique déterminée et marqués au carbone 14 sur les fonctions acyles (1). Nous rapportons ici celles qui ont été les plus satisfaisantes.

Les ^{14}C -diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérols 1 et 1 bis, obtenus à partir de l'isopropylidène glycérol (1-4) (schéma 1), ont servi à la préparation de phospholipides saturés et insaturés.



X = Br, I

Tos : pCH₃φSO₂

Schéma 1

Préparation du diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol

L'estérification de l'halogéno-3 sn-glycérol a été effectuée par le chlorure de l'acide gras désiré, avec un rendement de 70 à 80 %. Une acylation séquentielle a permis d'accéder aux dérivés mixtes 1 bis. Les dérivés diacyl bromo et iodo-glycérol ont été synthétisés. Toutefois le dérivé bromé, plus stable, a été préféré au dérivé iodé, qui ne donne pas de rendement meilleur dans la condensation avec les différents sels d'argent d'esters phosphoriques employés dans la suite des synthèses.

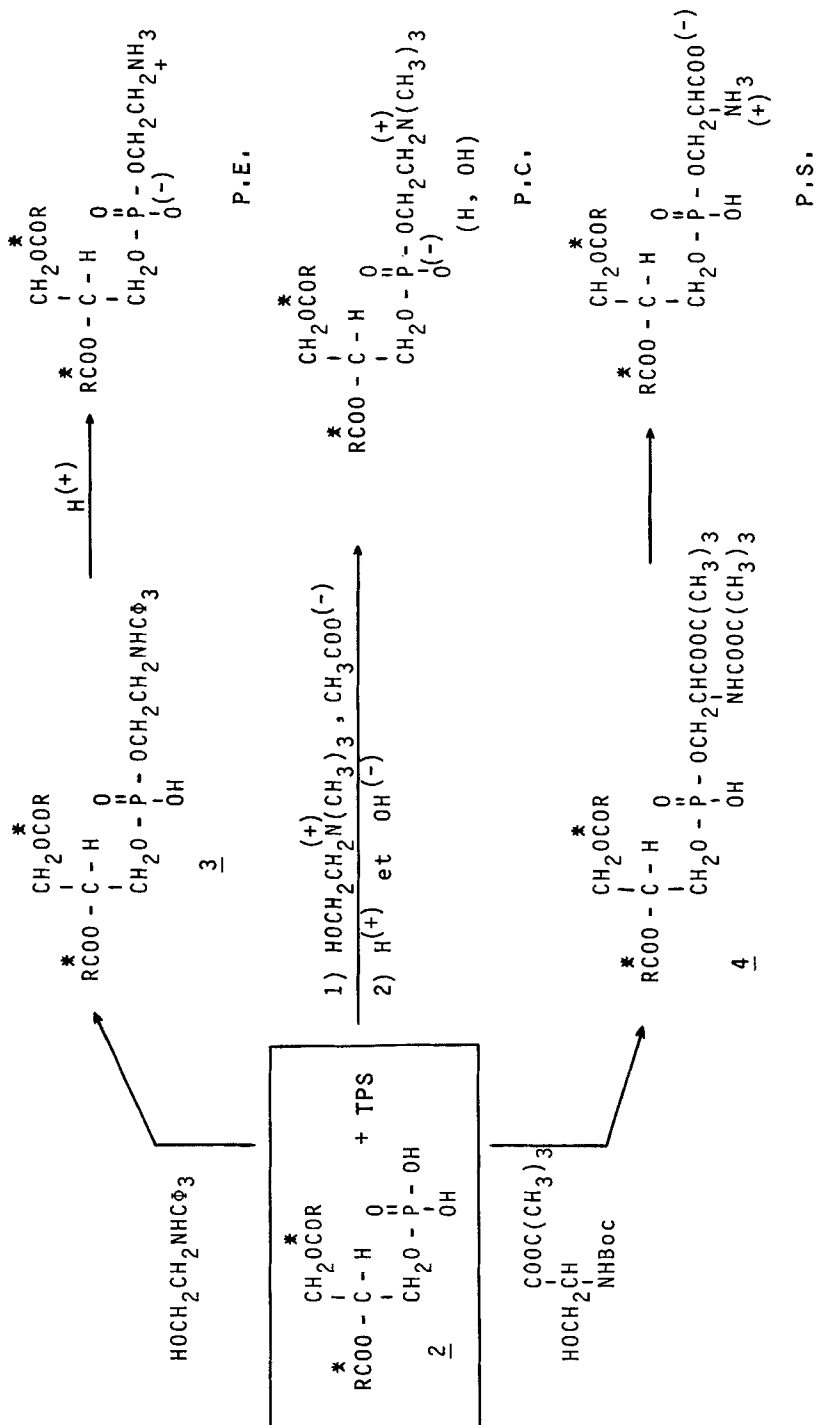


Schéma 2

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

1 - Préparation de phosphatidyl-éthanolamine (PE), -choline (PC) et -sérine (PS) saturées marquées au carbone 14

On a opéré selon le schéma 2. L'ainoalcool convenablement protégé est condensé sur l'acide phosphatidique 2. Celui-ci est facilement obtenu par condensation du sel d'argent du diester benzylrique de l'acide phosphorique 5 (5) sur le diacyl-bromo-glycérol suivie d'une hydrogénéolyse sur charbon palladié (6) (schéma 3).

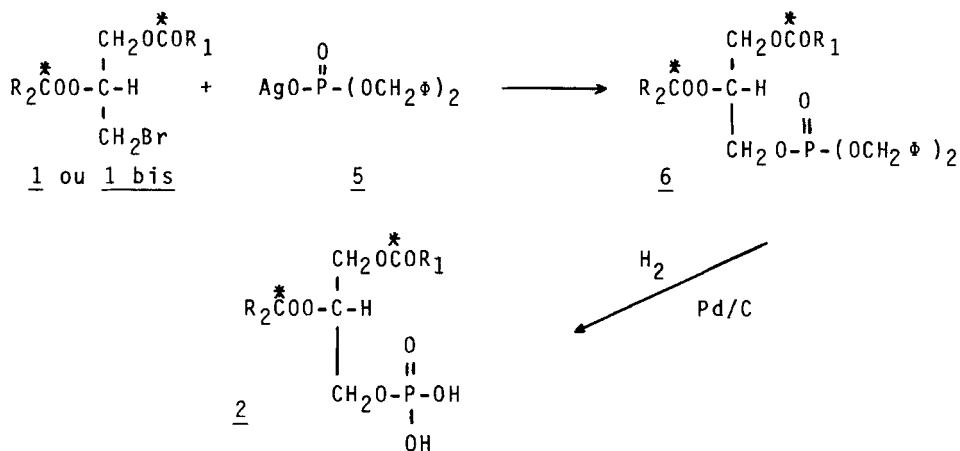


Schéma 3

Préparation d'acide phosphatidique saturé marqué au carbone 14

Les amino-alcools N-protégés utilisés pour la synthèse de PE, PC, PS ont été respectivement :

- la N-trityléthanolamine (7), préparée par action du bromure de trityle sur l'éthanolamine en présence de pyridine ;
- l'acétate de choline (8) 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) ;
- l'ester t-butylrique de la N-t-butoxycarbonyl-L-sérine préparé par estérification de la O-benzyl N-t-Boc L-sérine par l'isobutylène et régénération de la fonction hydroxyle par hydrogénéolyse (9).

En présence du chlorure de l'acide triisopropylbenzène sulfonique (TPS) (10), la liaison ester phosphorique est créée entre l'acide phosphatidique et l'ainoalcool N-protégé.

Le phospholipide protégé ainsi formé est ensuite traité de façon appropriée pour éliminer les groupes protecteurs (schéma 2).

Les dipalmitoyl-phosphatidyl-sérine (1 mCi/mMole), -choline (1 mCi/mMole) et -éthanolamine (1,2 et 20 mCi/mMole) ont été ainsi synthétisées avec un rendement respectif de 11 %, 25 % et 30 % par rapport à l'acide palmitique ^{14}C .

2 - Préparation de phosphatidyl-éthanolamine insaturée (ou mixte)

Dans ces cas, il est absolument nécessaire de suivre un protocole expérimental ne faisant intervenir aucune hydrogénation catalytique.

La voie de synthèse retenue (schéma 4) ne comporte évidemment pas d'hydrogénolyse catalytique pour la déprotection des P.E.

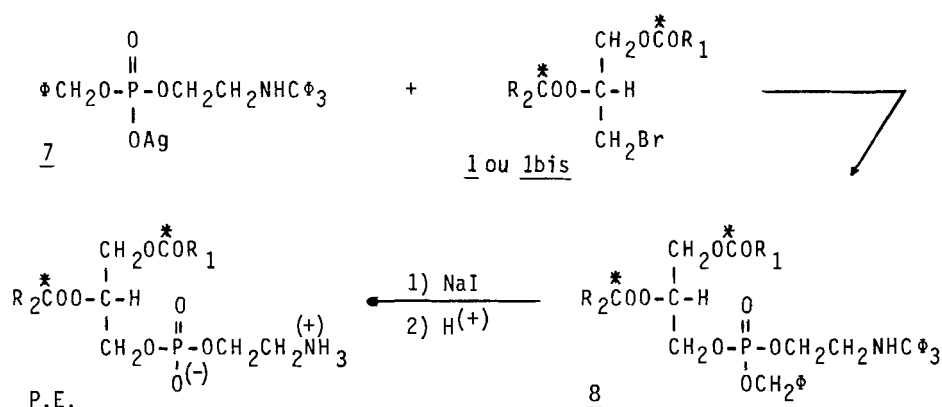


Schéma 4

Préparation de phosphatidyl éthanolamine insaturée (ou mixte) marquée au carbone 14

Ces dernières ont été obtenues en condensant le diacyl-1,2 halogéno-3 sn-glycérol 1 ou 1 bis avec le sel d'argent de l'acide phosphorique substitué 7 dans lequel une liaison ester-phosphorique a déjà été réalisée à l'aide d'iodoéthylamine N-trityl (11).

La phosphatidyl-éthanolamine 8 protégée est débenzylée par action de l'iodure de sodium. Comme dans le cas des P.E. saturées, le groupe trityle est ensuite éliminé par hydrolyse acide.

Nous avons par cette méthode réalisé la synthèse de dioléyl sn-P.E. (1 mCi/mMole) avec un rendement de 28 % par rapport à l'acide oléique ^{14}C . L'utilisation du palmitoyl-1 oléyl-2 bromo-3 sn-glycérol a permis, de la même façon, l'accès aux P.E. mixtes.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Chlorures d'acyloyles ^{14}C

Sous courant d'azote sec et agitation magnétique, à 10 mMoles d'acide gras ^{14}C dissoutes dans 5 ml de benzène anhydre, sont ajoutés 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. On agite pendant 2 heures à température ambiante, puis on chauffe une heure et demi à reflux. L'évaporation complète du benzène et de l'excès de chlorure de thionyle est effectuée sous vide de 0,8 mm de mercure en évaporateur rotatif. Les chlorures d'acides sont utilisés sans autre purification.

2 - Dipalmitoyl- et dioléyl-1,2 bromo-3 sn-glycérol 1

Sous courant d'azote sec, à 760 mg (4,5 mMoles) de bromo-glycérol 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 ml de benzène. Après agitation magnétique à température ambiante pendant 48 heures, arrêter la réaction en ajoutant de l'eau glacée. Rajouter de l'éther, extraire la phase organique et la laver.

Une chromatographie sur colonne de "silice H" (70 parties) éluée par le mélange hexane/éther : 3/2 ou le benzène, permet une très bonne séparation quantitative du dérivé halogéné formé avec un rendement de 70 à 80 % par rapport à l'acide gras marqué. La dipalmitoyl-bromohydrine se présente sous forme de beaux cristaux blancs tandis que la dioléyl-bromohydrine reste huileuse.

a) Caractérisation de la dipalmitoyl-bromohydrine

CCM :

hexane/éther : 3/2 , $R_F = 0,7$ ou benzène $R_F = 0,6$

RMN :

 $\delta = 5,2$ ppm (m - 1H - H du squelette glycérol C_2) $\delta = 4,3$ ppm (m - 2H - H portés par le carbone C_1) $\delta = 3,5$ ppm (d - 2H - H portés par le carbone C_3) $\delta = 2,25$ ppm (m - 4H - 2 CH_2 en α du CO) $\delta = 1,2$ ppm (s - 52H - CH_2 de la chaîne de l'acide palmitique) $\delta = 0,8$ ppm (m - 6H - 2 CH_3 méthyles terminaux)

SM :

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 % , $CH_3(CH_2)_{14}$; 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) Caractérisation de la dioléyl-bromohydrine

RMN :

 $\delta = 5,3$ ppm (t - 4H - éthyléniques) $\delta = 5,1$ ppm (m - 1H - H du squelette glycérol) $\delta = 4,5$ ppm (m - 2H - $CH_2(C_3)$ du squelette glycérol) $\delta = 3,7$ ppm (dd - 2H - $CH_2(C_1)$ du squelette glycérol) $\delta = 2$ ppm (m - 12H - 2(CH_2CO) et 4($CH_2-C=C-$) $\delta = 1,25$ ppm (s - 44H - CH_2 de la chaîne des acides gras) $\delta = 0,8$ ppm (m - 6H - méthyles)

SM :

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

3 - Palmitoyl ^{14}C -1 oléyl ^{14}C -2 bromo-3 sn-glycérol 0,8 mCi/mMole

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

Sous forte agitation magnétique, 4 mMoles (2 mCi) de chlorure de palmitoyle dissoutes dans 10 ml de benzène anhydre sont ajoutées très lentement à 12 mMoles de bromoglycérol dissous dans 1 ml de pyridine anhydre et 2 ml de benzène anhydre. Après 48 heures à température ambiante, une CCM (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 μCi ; activité spécifique : 0,49 mCi/mMole) d'un produit solide blanc, (rendement : 40 % par rapport à l'acide palmitique ^{14}C).

RMN :

- $\delta = 4$ ppm (d - 2H - CH_2Br)
- $\delta = 3,7$ ppm (m - 1H - squelette glycérol)
- $\delta = 3$ ppm (d - 2H - CH_2OCO)
- $\delta = 2,8$ ppm (m - 1H - proton hydroxyle)
- $\delta = 2$ ppm (m - 2H - CH_2CO)
- $\delta = 1,2$ ppm (s - 26H - méthylènes)
- $\delta = 0,7$ ppm (m - 3H - méthyle)

SM :

- m/e 392 - 394, 8 % , M^+ ; m/e 299, 20 % ($\text{M}-\text{CH}_2\text{Br}$)⁺ ;
- m/e 270, 35 % ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_2 + \text{H}$)⁺ ;
- m/e 255, 16 % (RCOO)⁺ ; m/e 239, 100 % $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}^+$;
- 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
(1 bis)

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 CCM (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" éluée par le benzène. On recueille 650 μ Ci (rendement actif : 81 %) d'un produit liquide translucide dont le poids est de 550 mg (activité spécifique = 0,8 mCi/mMole).

RMN :

$\delta = 5,5$ ppm (m - 3H - 2H éthyléniques, H du squelette glycérol)

$\delta = 4,5$ ppm (m - 2H - CH_2Br)

$\delta = 3,65$ ppm (d - 2H - CH_2O)

$\delta = 2,3$ ppm (m - 10H - 3 (CH_2CO) et 2 CH_2 en α de la double liaison)

$\delta = 1,4$ ppm (s - 62H - méthylènes des acides gras)

$\delta = 0,9$ ppm (m - 6H - 2 méthyles)

SM :

m/e 656 - 658, 1 %, M^+ ; m/e 401 - 403, 8 % ($M-PalCOO$)⁺ ;

m/e 375 - 377, 12 % ($M-O1COO$)⁺ ; m/e 265, 33 % ($O1CO$)⁺ ;

m/e 264, 100 % ; m/e 239, 28 % ($PalCO$)⁺.

4 - Acide phosphatidique 2

a) Ester dibenzilyque de l'acide phosphatidique 6

Dans une ampoule à sceller contenant 3 mMoles (1,15 g) du sel d'argent 5 parfaitement sec et une pointe de spatule d'iodure de sodium anhydre, ajouter en boîte à gants 0,88 mMole (0,88 mCi, activité spécifique = 1 mCi/mMole) de dipalmitoyl-bromo sn-glycérol dissous dans 10 ml de benzène anhydre. L'ampoule est alors fixée sur une 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 qui est mis en rotation à l'intérieur d'une étuve 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.

Une CCM (chloroforme/éther : 9/1) indique la présence d'un nouveau produit ($R_F = 0,8$) visible en UV, 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 6 est effectuée par chromatographie sur plaque préparative (solvant : chloroforme/éther : 9/1). Le produit attendu est localisé sous rayonnement UV et par autoradiographie de la plaque préparative.

Après récupération de la silice et extraction par l'éther, on recueille 525 mg (0,69 mCi ; rendement actif par rapport au dérivé bromé : 78 %) d'un beau produit blanc (activité spécifique = 1 mCi/mMole).

RMN :

- $\delta = 7,3$ ppm (s - 10H - 10H des groupes benzyles)
- $\delta = 5$ ppm (d - 5H - 4H des CH_2 des groupes benzyles et 1H du squelette glycérol C_2)
- $\delta = 4,1$ ppm (m - 4H - 2 CH_2 du C_1 et C_3 du squelette glycérol)
- $\delta = 2,2$ ppm (m - 4H - 2 CH_2 en α du Co)
- $\delta = 1,15$ ppm (s - 52H - hydrogènes de la chaîne de l'acide palmitique)
- $\delta = 0,9$ ppm (m - 6H - 2 méthyles de l'acide palmitique)

b) Acide dipalmitoyl-phosphatidique (P.A.) (1 mCi/mMole) 2

Une suspension de 100 mg (0,12 mMole) de phosphatidate bis-benzylé 6 dans 2 ml d'éthanol absolu est agitée pendant 3 heures à température ambiante en présence de catalyseur Pd/C 10 % et sous atmosphère d'hydrogène. Les chromatographies (chloroforme/éther : 9/1 ; éther/éthanol/acide acétique/eau : 75/1,5/1/1) montrent la disparition totale du dérivé benzylé. L'acide phosphatidique 2, soluble dans l'éthanol, est récupéré après filtration, lavages du catalyseur et évaporation de l'alcool (65 mg ; 0,1 mCi ; activité spécifique = 1 mCi/mMole). Le rendement actif en acide phosphatidique 2 par rapport au dérivé dibenzylé 6 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.

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

a) Condensation avec la N-trityléthanolamine 3

En boîte à gants, 70 mg de N-trityléthanolamine (0,23 mMole) sont mis à réagir avec 100 mg (0,33 mMole) de TPS dans 2,5 ml de pyridine anhydre durant une demi-heure à température ambiante. Au bout de ce temps, l'acide phosphatidique 2 (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 sans 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 préparée et purifiée sur une colonne de "Sephadex" LH 20 éluée par le chloroforme. Le rendement actif de formation de 3 déterminé par enregistrement des CCM, est de 55 % par rapport à l'acide phosphatidique.

b) Dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamine (1 mCi/mMole)

Au résidu sec 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 se forment (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. On obtient 30 mg (44 μCi) (activité spécifique = 1 mCi/mMole) d'un produit cristallisé blanc, dont le point de fusion est 192° C ; le rendement radioactif est de 80 % par rapport au dérivé tritylé. La P.E. ^{14}C ainsi obtenue a en CCM les mêmes R_F dans les systèmes de solvants: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 65/25/5 et $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$: 80/40/5/7 qu'une P.E. témoin et une P.E. faiblement radioactive obtenue par une autre méthode (révélation par la ninhydrine et le réactif de Dittmer (12)). La pureté radiochimique est de 96 %.

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

A 0,1 mMole (100 μCi) d'acide phosphatidique dipalmitoylé 2 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 résine D.E. 52 (OH^-) mélangée avec 10 g de résine IRC 50 (H^+).

La phosphatidyl choline est isolée du mélange réactionnel par chromatographie sur plaque préparative ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 65/25/4). Le produit blanc obtenu pèse 44 mg pour une activité de 60 Ci (activité spécifique = 1 mCi/mMole), soit un rendement actif de 60 % par rapport à l'acide phosphatidique. Les contrôles par CCM dans les solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 65/25/4 ($R_F = 0,35$) et $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$: 80/40/5/7 ($R_F = 0,55$; tache élargie due à la formation de sels) permettent de prouver la structure et d'indiquer que la pureté est de 99 %.

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

A 0,25 mMole (0,25 mCi) d'acide dipalmitoyl-phosphatidique 2, 0,05 mMole (130 mg) de L-sérine protégée (9) 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 1 heure à la température ambiante puis additionner d'eau. Différentes CCM, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5,7 ou 10 %, indiquent la présence d'un produit phosphoré actif (60 % de la radioactivité totale). Un essai de déprotection par HCl anhydre effectué sur la moitié du produit réactionnel n'ayant pas donné des résultats nets, l'autre moitié (110 μCi) est fractionnée par chromatographie sur plaque préparative (CHCl_3 , MeOH : 7 %). On recueille la fraction 4 ayant un R_F de 0,8 (55 μCi , rendement 50 % par rapport à l'acide phosphatidique).

Cette fraction 4 est dissoute dans 100 ml de chloroforme anhydre. La déprotection simultanée de la fonction amine et carboxyle est effectuée par addition de HCl gazeux dans le mélange chloroformique à 0°C. On suit l'évolution de la réaction par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$) avec de la P.S. inactive témoin. Après 5 heures d'action de HCl à 0° C, la solution chloroformique acidifiée est maintenue à - 20° C une nuit. Effectuer ensuite une chromatographie sur plaque préparative dans le solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

Le produit élué 15 mg (20 μ Ci, activité spécifique = 1 mCi/mMole, 36 % par rapport au dérivé diprotégé 4) a une migration identique à la P.S. 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. La P.S. est révélée par la ninhydrine et le réactif de Dittmer. Aucune autre tache n'est révélée 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 %.

8 - Ester benzylique de la dioléyl P.E. N-tritylée 8

Dans une ampoule à sceller, 1,75 mMole (1,75 mCi) de dioléyl-bromohydrine sont dissoutes dans 9 ml de benzène anhydre. Après addition d'une pointe de spatule d'iodure de sodium sec et 4 mMoles (2,3 g) du sel d'argent 7, l'ampoule est scellée sous vide. La réaction est effectuée à 85° C pendant 9 heures en étuve munie d'un dispositif d'agitation. Après filtration (Millipore 5 μ), le mélange réactionnel est fractionné par chromatographie sur plaque préparative élue par le mélange hexane/éther : 1/1 contenant 1 % de triéthylamine. Le triester phosphorique 8 est récupéré sous forme d'une huile épaisse 875 mg (800 μ Ci ; activité spécifique = 0,98 mCi/mMole) soit un rendement de 46 % par rapport à la bromohydrine.

RMN :

$\delta = 7,4$ ppm (m - 20H - protons aromatiques)

$\delta = 5,3$ ppm (t - 5H - 4H éthyléniques, 1H du squelette glycérol)

$\delta = 5$ ppm (d - 2H - $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}$)

$\delta = 4,1$ ppm (m - 6H - $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}$, $2(\text{CH}_2-\text{O}-\text{P})$)

$\delta = 2$ ppm (m - 10H - $(-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N})$ $(\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}})$ $(\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-)$)

$\delta = 1,25$ ppm (s - 58H - autres méthylènes de la chaîne)

$\delta = 0,8$ ppm (m - 6H - 2 méthyles de l'acide oléique)

9 - Débenzylation, détritylation, obtention de la dioléyl sn-phosphatidyl-éthanolamine 1 mCi/mMole

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. Cette 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'HClN, la solution est évaporée.

Un contrôle par CCM montre que le rendement de formation de la P.E. est de 90 % mais indique la présence d'impuretés inactives, visibles à l'iode. Une tentative de purification sur une colonne de LH 20 (CHCl₃/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 (CHCl₃/MeOH/H₂O : 65/25/4) permet d'obtenir 330 mg (0,445 mMole ; 450 μ Ci ; activité spécifique = 0,99 mCi/mMole) d'un produit pâteux à température ambiante. Le rendement actif est de 75 % par rapport au triester 8. Les contrôles effectués dans les solvants CHCl₃/MeOH/H₂O : 65/25/4, et CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O : 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'UV, 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 CCM (CHCl₃/MeOH/H₂O). La phosphatidyl-éthanolamine active (R_F = 0,7) disparaît tandis qu'apparaissent simultanément, et avec le même pourcentage de radioactivité, l'acide gras libéré (R_F = 1) et la lysophosphatidyléthanolamine ainsi produite (R_F = 0,35).

REFERENCES

- 1 - DANAN J.L. - "Synthèses de glycérides et de glycérophospholipides marqués au carbone 14." - Thèse de Doctorat ès-Sciences Mars 1977 - Université Paris XI

- 2 - BIRD R. et CHADHA J. - Tetrahedron Letters, 4541 (1966)
- 3 - BAER E., SURUKI Y., BLACKWELL J. - Biochem., 2 1227 (1963)
- 4 - DANAN J.L. et PICHAT L. - Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, XVI (2) 235 (1979)
- 5 - SERVAS L. et DILARIS I. - J. Amer. Chem. Soc., 77 5354 (1955)
- 6 - CHADHA J.S. - Chem. Phys. Lipids, 2 415 (1968)
- 7 - BUCKUS P. - Zh. Org. Khim., 6 (10) 1984 (1970)
- 8 - ANEJA R. et CHADHA J.S. - Biochim. Biophys. Acta, 248 455 (1971)
- 9 - DE HAAS G.H., LUTPHEN H., BONSEN P. et VAN DEENEN L. - Rec. Trav. Chim., 83 99 (1964)
- 10 - ANEJA R., CHADHA J.S., DAVIES P. - Biochim. Biophys. Acta, 218 102 (1970)
- 11 - BILLIMORIA J.D. et LEWIS K.O. - J. Chem. Soc., 1407 (1968)
- 12 - DITTMER J.C. et LESTER R.L. - J. Lip. Res., 5 126 (1964)