



HAL
open science

Synthèse et interactions membranaires du chlorogénate de méthyle

Franck Bérard

► **To cite this version:**

Franck Bérard. Synthèse et interactions membranaires du chlorogénate de méthyle. Sciences pharmaceutiques. 1993. dumas-02364156

HAL Id: dumas-02364156

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02364156v1>

Submitted on 14 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

2^e année

UNIVERSITE Joseph FOURIER GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine

U.F.R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1993

N° D'ORDRE : 7034

**SYNTHESE ET INTERACTIONS MEMBRANAIRES
DU CHLOROGENATE DE METHYLE.**

THESE

Présentée à l' Université Joseph FOURIER GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Monsieur Franck BERARD

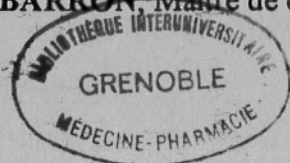
[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 30 Juin à 17 heures

Devant Madame le Professeur A.M MARIOTTE, Présidente du Jury

Monsieur J. VIRET, Maître de recherche du S.S.A.

Monsieur D. BARRON, Maître de conférences



UNIVERSITE Joseph FOURIER GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine

U.F.R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1993

N° D'ORDRE :

**SYNTHESE ET INTERACTIONS MEMBRANAIRES
DU CHLOROGENATE DE METHYLE.**

THESE

Présentée à l' Université Joseph FOURIER GRENOBLE I

pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Monsieur Franck BERARD

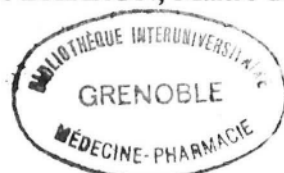
[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 30 Juin à 17 heures

Devant Madame le Professeur A.M MARIOTTE, Présidente du Jury

Monsieur J. VIRET, Maître de recherche du S.S.A.

Monsieur D. BARRON, Maître de conférences



A la mémoire de mon père.

A ma mère.

A mes frères et soeurs.

A mes amis.

A Véronique.

REMERCIEMENTS

A Madame le professeur Mariotte qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Je la remercie de l'aide qu'elle m'a apportée pour la réalisation de ce travail.

A Monsieur Viret, Médecin en Chef, qui m'a accueilli dans son laboratoire du C.R.S.S.A. et qui a bien voulu juger ce travail.

Je le remercie pour ses précieux conseils.

A Monsieur Barron, Maître de conférences, qui a guidé mes travaux à la faculté avec dynamisme.

A Messieurs Daveloose et Debouzy qui ont contribué à la mise au point et au déroulement des manipulations.

PLAN

INTRODUCTION	Page 6
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE DE CHLOROGENATE DE METHYLE.	Page 8
<u>I) Méthodes de synthèse précédemment décrites.</u> Page 11	
<u>II) Synthèse de caféoyl-5 quinate de méthyle par greffage direct par le N, N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC).</u>	Page 11
<ul style="list-style-type: none"> II-1) généralités sur le DCC. II-2) synthèse d'amides par le DCC. II-3) synthèse d'esters d'alcools primaires par le DCC . II-4) synthèse de flavonoïdes sulfatés par le DCC. II-5) greffage direct avec le DCC de quinate de méthyle avec l'acide caféique. <ul style="list-style-type: none"> II-5-a) synthèse de quinate de méthyle. II-5-b) synthèse d'acide carbométhoxy-3, 4 caféique . 	
<u>III) Protection des hydroxyles quiniques sous la forme de dérivés méthoxyméthylène.</u>	Page 14
<u>IV) Synthèse directe du chlorogénate de méthyle.</u>	Page 14
Conclusions sur la synthèse.	Page 16

V) Modes opératoires.

Page 17

- V-1) synthèse directe du chlorogénate de méthyle dans le méthanol acide.
- V-2) synthèse de quinate de méthyle.
- V-3) synthèse d'acide carbométhoxy-3, 4 caféique.
- V-4) greffage direct par le DCC du quinate de méthyle avec l'acide carbométhoxy-3, 4 caféique.
- V-5) synthèse d'acide méthoxyméthylène quinique.

VI) Analyse spectrale.

Page 22

DEUXIEME PARTIE :

INTERACTIONS CHLOROGENATE DE METHYLE -MEMBRANES.

I) Introduction.

Page 27

- I-1) Généralités sur la Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) et la Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.).
 - I-1-a) Les applications de la R.M.N.
 - I-1-b) Les applications de la R.P.E.
- I-2) Les membranes.
 - I-2-a) Les membranes naturelles.
 - I-2-b) Les membranes modèles.
 - I-2-c) Rôle des membranes biologiques.

II) Etude R.M.N. des interactions du chlorogénate de méthyle sur des membranes modèles.

Page 34

- II-1) Etude de la structure et de la localisation en milieu membranaire de SUV du chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^1H .
- II-2) Etude de la structure membranaire au niveau des chaînes lipidiques en présence de chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^2H .
- II-3) Etude de la structure membranaire au niveau de la partie polaire des phospholipides en présence de chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^{31}P .

III) Etude par R.P.E. des interactions membranaires du chlorogénate de méthyle sur des membranes naturelles.

Page 41

III-1) La technique des marqueurs de spin.

III-1-1) les marqueurs utilisés.

III-1-1-a) propriétés physico-chimiques des marqueurs.

III-1-1- b) propriétés spectrales des marqueurs en R.P.E.

III-1-2) mode d'enregistrement des spectres.

III-2) Etude par R.P.E. de l'action du chlorogénate de méthyle sur les membranes.

Page 44

III-2-1) Etude par R.P.E. de l'interaction chlorogénate de méthyle - hématies

III-2-2) Etude par R.P.E. de l'interaction chlorogénate de méthyle - ghosts.

a) essai de mise en évidence d'interaction par spectrophotométrie d'absorption dans l'U.V.

b) étude de l'interaction du chlorogénate de méthyle avec les ghosts.

c) étude de l'influence de la teneur en calcium.

d) étude de l'interaction chlorogénate de méthyle - protéines de ghosts.

III-3) Partie expérimentale : préparation des échantillons de R.P.E.

Page 55

CONCLUSION.

Page 58

BIBLIOGRAPHIE.

Page 60

INTRODUCTION

Le chlorogénate de méthyle est un composé extrait de *Meum athamanticum* Jacq., famille des Ombellifères.

Le rhizome de cette plante, appelée fenouil des alpes, est utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés stimulantes, stomachiques, diurétiques, pectorales (Garnier, 1961).

Dans les extraits aqueux et méthanoliques du rhizome, six esters d'acides phénols ont été identifiés dont notamment le chlorogénate de méthyle et le férulate de méthyle (Barron, 1983).

L'activité antiagrégante plaquettaire des chlorogénate de méthyle ou férulate de méthyle a été démontrée lors d'une précédente étude (Barron, 1983).

Le test utilisé (Born, 1965) étudiait la variation de la densité optique de plasma riche en plaquettes, cinq minutes après l'introduction d'un agent agrégant, ce qui permettait, après ajout des chlorogénate ou férulate de méthyle, de déterminer le pourcentage d'inhibition de l'agrégation par ces produits.

Le pourcentage d'inhibition de l'agrégation par le chlorogénate de méthyle ou le férulate de méthyle était respectivement de 23 et 54 pour l'agrégation induite par l'ADP, 36 et 13 pour l'agrégation induite par le collagène, 70 et 6 pour l'agrégation induite par l'adrénaline.

La faible spécificité du test utilisé n'a pas permis de définir un mécanisme d'action précis et les auteurs ont conclu à la nécessité d'utiliser d'autres méthodes d'investigation afin de préciser ce dernier:

Pour notre part, nous envisagerons dans ce travail une action membranaire de cette drogue antiagrégante.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'action membranaire d'un de ces esters d'acides phénol, le chlorogénate de méthyle.

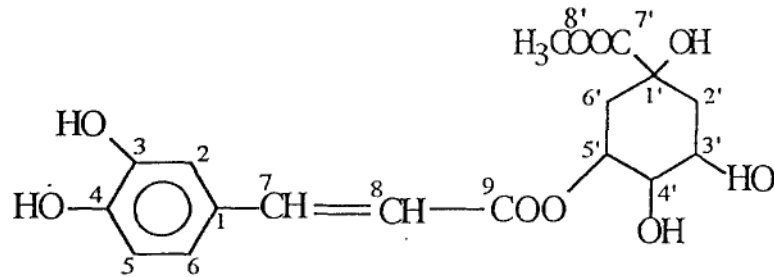
Au cours de la première partie de ce travail, nous décrivons la synthèse organique de chlorogénate de méthyle, effectuée au laboratoire de pharmacognosie de l'U.F.R. de Pharmacie de La Tronche.

Dans une deuxième partie, nous nous attacherons à préciser les interactions drogue-membrane par des méthodes spectroscopiques (R.M.N. et R.P.E.) sur des membranes modèles et sur des membranes naturelles (globule rouge). Ces travaux ont été effectués dans l'unité de Biophysique du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, à La Tronche.

PREMIERE PARTIE :

**SYNTHESE DE
CHLOROGENATE DE METHYLE**

Le chlorogénate de méthyle ou caféoyl-5 quinate de méthyle est l'ester méthylique de l'acide [dihydroxy-3,4 cinnamoyl]-5 tétrahydroxy-1,3,4,5 cyclohexane carboxylique, c'est un ester entre l'acide caféique et le quinate de méthyle. Sa formule est représentée ci-dessous :



Les résultats obtenus par Barron et coll. en 1983 sur l'activité antiagrégante plaquettaire d'esters d'acides phénols déterminèrent le but premier de ce travail : la synthèse d'isomères du chlorogénate de méthyle. En effet, l'estérification du carboxyle de l'acide caféique est possible sur un des quatre groupes hydroxyles du méthyle quinate situés en 1, 3, 4 et 5.

Les tests d'interactions de ces trois composés avec des membranes auraient pu permettre de vérifier la variation de l'interaction en fonction de la conformation spatiale. A terme ces résultats permettraient de définir une relation entre la structure chimique et l'activité pharmacologique. Malheureusement, de nombreuses difficultés rencontrées au cours de la synthèse, notamment l'absence de résultat par rapport aux méthodes décrites dans la littérature, firent que seul le caféoyl-5 quinate de méthyle put être synthétisé.



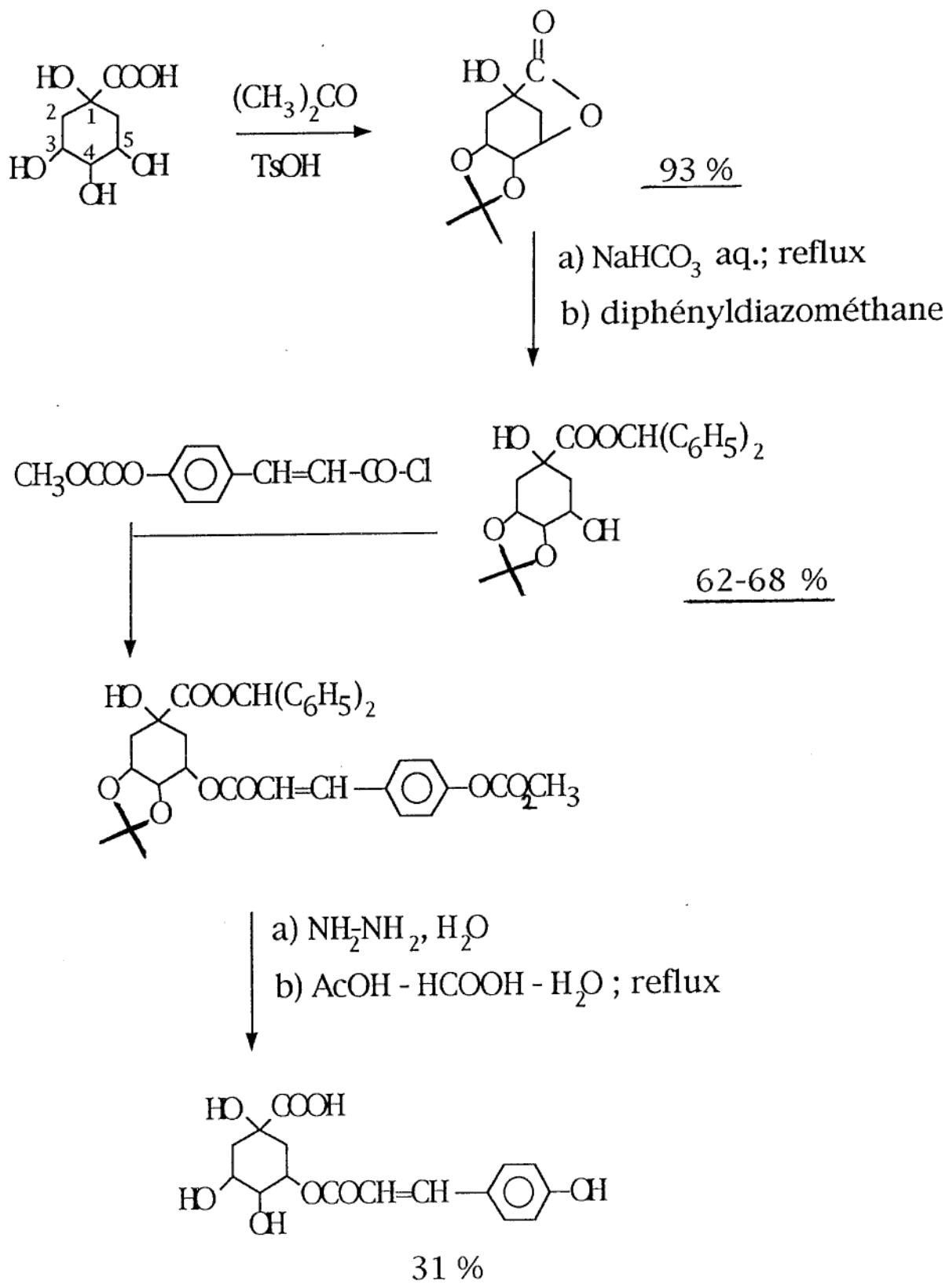


Schéma " Principe de la synthèse des esters hydroxycinnamoyl-5 quiniques ".

I) Méthodes de synthèse précédemment décrites

Une des méthodes les plus récentes de synthèse de dérivés d'acides cinnamoyl-5 quiniques est décrite dans la littérature (De Pooter et al., 1975 et 1976).

Le schéma " Principe de la synthèse des esters hydroxycinnamoyl-5 quiniques " résume cette méthode.

La méthode implique à la fois une protection des hydroxyles de l'acide hydroxycinnamique et de ceux de l'acide quinique.

- concernant l'acide hydroxycinnamique, le protecteur des fonctions phénol est le groupement carbométhoxy.

- concernant le motif quinique, les hydroxyles en 3 et 4 sont protégés sous la forme d'un acétal (isopropylidène) alors que la fonction acide est estérifiée par un groupe diphénylméthyl.

La protection de l'hydroxyle en 1 n'est pas nécessaire du fait de son encombrement stérique.

Bien que le schéma représente lui-même une amélioration importante des méthodes précédentes, les rendements en acides hydroxycinnamoyl-5 quiniques demeurent peu élevés, principalement du fait des conditions requises pour l'élimination de l'acétal (milieu acide à chaud).

Notre travail consistait donc à tenter d'explorer d'autres méthodes de synthèse des dérivés cinnamoyl quiniques.

II) Synthèse de caféoyl-5 quinate de méthyle par greffage direct par le N, N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC).

II-1) généralités sur le DCC.

Kurzer et en 1967 et Felder en 1973 réussissent la préparation d'esters d'acides aliphatiques, phénoliques et hétérocycliques avec des alcools par greffage direct en milieu pyridinique, à température ambiante.

Le DCC, en captant la molécule d'eau formée par la réaction, précipite en dicyclohexylurée.

Les rendements obtenus (de 60 à 98% selon les conditions de chauffage) sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec des chlorures d'acides.

De ce fait, cette méthode est largement utilisée, notamment dans la préparation de peptides, nucléotides et de nombreux autres esters.

II-2) synthèse d'amides par le DCC.

Tanaka décrit en 1989 la synthèse d'amides avec le DCC en milieu tétrahydrofurane, à température ambiante. Le DCC capte également une molécule d'eau.

L'estérification directe (sans protection) entre l'acide férulique et une amine primaire amène ici aussi des rendements élevés (jusqu'à 95 %).

II-3) synthèse d'esters d'alcools primaires par le DCC.

Talapatra en 1989 décrit l'estérification directe avec le DCC en solution dans le dichlorométhane entre l'acide coumarique et un alcool primaire, le triacontanol.

Le rendement obtenu est toujours important (70 %).

Bernards confirme ce résultat en 1992 : en solution dans la pyridine, à température ambiante, la réaction entre l'acide férulique (dont les groupements phénoliques ont été auparavant protégés par un groupe tétrahydropyrane) et plusieurs alcools primaires à longue chaîne hydrocarbonée conduit à des rendements variant de 40 à 66 %.

II-4) synthèse de flavonoïdes sulfatés par le DCC.

La sulfatation de flavones et de flavonols avec le DCC dans la pyridine est obtenue par Barron en 1987 avec des rendements allant jusqu'à 90 %, selon les conditions réactionnelles employées.

Cette méthode met surtout en évidence la sulfatation sélective par le DCC des hydroxyles phénoliques les plus acides du noyau flavonoïde.

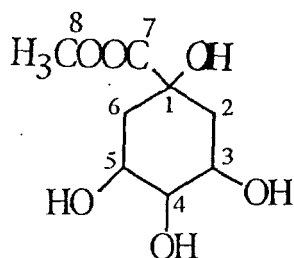
Les résultats de la bibliographie permettent ainsi d'espérer que l'emploi du DCC est une méthode indiquée pour la synthèse du chlorogénate de méthyle par greffage direct.

II-5) greffage direct avec le DCC de quinate de méthyle avec l'acide caféique.

La protection des groupements hydroxyles en 3 et 4 de l'acide caféique est essentielle pour éviter une étherification de ces groupements par les hydroxyles du quinate de méthyle. De Pooter en 1975 et 1976 et Bernards en 1992 ont utilisé cette méthode.

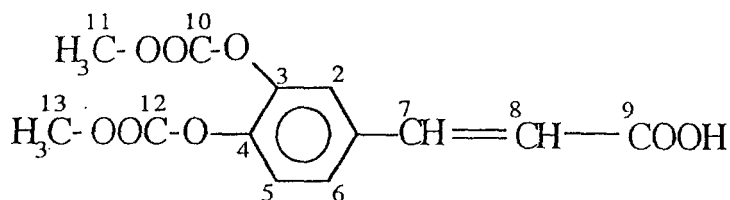
II-5-a) synthèse de quinate de méthyle.

Après un échec en utilisant le méthanol en milieu acide, le diazométhane a été utilisé avec succès. Le diazométhane est un agent méthylant de groupes carboxyliques, avec lequel de forts rendements sont obtenus sur de nombreux acides (Black, 1983; Furniss, 1989). Ces faits sont confirmés ici par l'obtention d'un rendement de 100 %.



II-5-b) synthèse d'acide carbométhoxy-3, 4 caféique .

Suite à l'échec de la réaction avec le triphénylméthyle (du fait de l'instabilité des composés obtenus), la méthode de protection d'hydroxyles phénoliques par le méthyl chloroformate (Fisher, 1912) se révèle être bonne malgré un rendement de 51%, inférieur aux valeurs décrites dans la littérature.



Ces deux composés ayant été synthétisés, le greffage direct par le DCC du quinate de méthyle à l'acide carbométhoxy-3, 4 caféique ne donna pas satisfaction car le produit majoritaire de la réaction fut le caféate de méthyle et non pas le chlorogénate de méthyle attendu.

Les très bons résultats obtenus dans la littérature en ce qui concerne la spécificité de greffage pour les alcools primaires et les flavonoïdes sulfatés n'ont pas été reproduits ici.

Une première explication a été l'instabilité du chlorogénate de méthyle en solution, car la liaison ester est une liaison assez fragile, ceci ayant pour conséquence une trans-estérification en caféate de méthyle.

L'explication est que les hydroxyles 3, 4 et 5 du quinate de méthyle sont des alcools secondaires, contrairement au méthanol, qui est un alcool primaire. La trans-estérification avec l'ester d'alcool primaire serait donc favorisée par rapport au greffage direct sur un alcool secondaire.

En activant la trans-estérification, la sonication utilisée pour obtenir la dissolution complète des composés peut aussi être mise en cause.

III) Protection des hydroxyles quiniques sous la forme de dérivés méthoxyméthylène.

L'utilisation du triméthyl orthoformate par Kume en 1985 sur des hydroxyles vicinaux (1, 2 diols) de nucléosides a permis l'obtention de dérivés méthoxyméthylénés correspondants. Il est à noter qu'au point de vue stérique, les deux hydroxyles sont en position axiale par rapport au plan de la molécule.

Contrairement au groupement isopropylidène, le groupement méthoxyméthylène est éliminable à froid et dans des conditions douces (acide formique suivi d'ammoniaque diluée). L'utilisation d'un tel groupement permettrait donc d'augmenter le rendement de l'étape de déprotection de l'acétal (voir le schéma précédent).

Le dérivé méthoxyméthylène de l'acide quinique, très instable au cours des opérations de purification, n'a pas pu être isolé. Son estérification directe par le chlorure de benzoyle, cependant, conduit à la formation de trois produits dont l'acide benzoyl-3 quinique est le plus important. Ces données permettraient d'envisager une protection impliquant les hydroxyles en 4 et 5 de l'acide quinique.

L'échec des méthodes précédentes nous a donc conduit à la synthèse directe de chlorogénate de méthyle à partir d'acide chlorogénique.

IV) Synthèse directe du chlorogénate de méthyle.

La méthylation du carboxyle de l'acide chlorogénique commercial est effectuée directement par le méthanol en milieu acide.

Le chlorogénate de méthyle est le seul produit de la réaction.

Après dilution par l'eau, le chlorogénate de méthyle est extrait par l'acétate d'éthyle avec un rendement de 40 % seulement.

Une extraction par le butanol présenterait l'avantage d'un bien meilleur rendement. Ce dernier solvant entraîne cependant d'importantes quantités d'eau et donc d'acide dans la phase organique. La présence d'acide pouvant conduire à des dégradations du composé au cours de la phase de concentration, nous avons donc préféré une extraction par l'acétate d'éthyle, bien que de rendement inférieur.

CONCLUSIONS SUR LA SYNTHÈSE.

Les méthodes précédemment décrites pour la synthèse de chlorogénates n'ont pas été améliorées.

La méthode de greffage par DCC a abouti à une trans estérification lors de la condensation avec le quinate de méthyle.

L'étude ultérieure d'une possibilité de condensation directe avec l'acide quinique pourrait supprimer cette trans estérification. Ceci pourrait être d'autant plus avantageux que l'ester méthylique peut être introduit très facilement en étape finale sur le cinnamoyl quinate.

Pour la protection par formation de dérivés méthoxyméthylènes, les résultats obtenus sont encourageants mais certains points sont encore obscurs.

Notamment, la nature exacte du dérivé méthoxyméthylène n'a pas pu être déterminée pour deux raisons :

- les difficultés de contrôle du produit final de la réaction : l'absence d'absorption en UV amène un problème lors de la purification.

- le triméthyl orthoformate forme des diastéréoisomères (il crée un carbone asymétrique) et donc le spectre R.M.N. est plus difficile à interpréter.

L'utilisation d'un groupement diméthoxyméthylène serait envisageable pour éviter la formation de diastéréoisomères.

Une détection autre que l'UV peut également être profitable. Un détecteur universel, tel qu'un détecteur à diffusion de lumière, pourrait résoudre le problème du contrôle.

V) Modes opératoires.

Après chaque synthèse, la structure des composés obtenus est vérifiée par R.M.N. du proton et du carbone.

V-1) synthèse directe du chlorogénate de méthyle dans le méthanol acide.

A 0,56 mmole (200 mg) d'acide chlorogénique (Aldrich) en solution dans 10 ml de méthanol, on ajoute goutte à goutte, à température ambiante, sous agitation, 1 ml d'acide chlorhydrique à 35 %. Après 4 heures d'agitation, le chlorogénate de méthyle est largement majoritaire.

Le contrôle par C.C.M. est effectué sur polyamide élué par un mélange eau/n-butanol/acétone/dioxane (75/15/10/5, v/v/v/v) et observé à 366 nm. Le chlorogénate de méthyle est identifié comparativement à des témoins d'extraction de *Meum athamanticum*.

Le milieu réactionnel est alors dilué par addition d'eau puis directement extrait par l'acétate d'éthyle. Au contrôle par C.C.M. de la phase organique, il s'avère que l'extraction n'est pas quantitative.

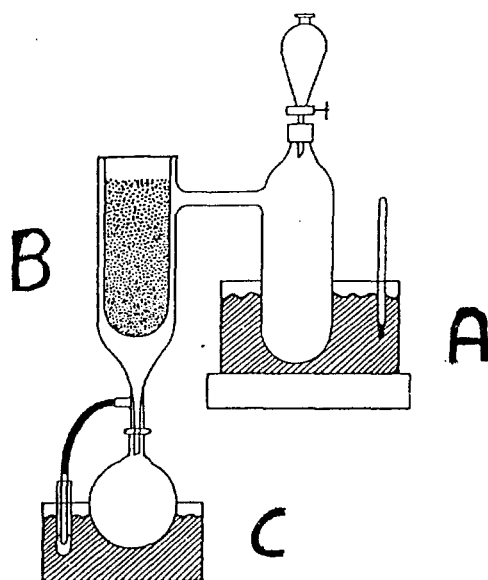
L'extraction de la phase aqueuse est donc répétée à dix reprises, les phases organiques sont réunies et évaporées à sec.

Les caractéristiques spectrales de R.M.N. du chlorogénate de méthyle sont réunies dans le tableau 1.

V-2) synthèse de quinate de méthyle.

Cette réaction est une méthylation de l'acide quinique par un excès de diazométhane.

Le diazométhane est formé à partir de N-méthyl N-nitroso toluène sulfonamide-4 (MNTS, Prolabo). La réaction conduisant à sa formation nécessite un appareillage spécifique (mini DIAZALD Aldrich) représenté ci-dessous :



La verrerie est munie de joints spécialement adaptés et d'un trop-plein de pression, du fait de la forte réactivité chimique du MNTS et des risques d'explosion que le diazométhane en solution étherée entraîne.

Une solution formée par 14 mmoles de MNTS dans 30 ml d'éther éthylique est ajoutée à une solution de 1 g de potasse dissoute dans 15 ml d'éthanol à 95°.

La solution, d'abord placée dans un bain de glace A, est ensuite réchauffée par un courant d'air chaud (séchoir).

Le diazométhane gazeux, formé par l'élévation de température, distille progressivement. Il est condensé sur un réfrigérant B constitué de glace carbonique dans l'acétone et recueilli dans un récipient C placé dans la glace.

Ajouté goutte à goutte à température ambiante, sous agitation, à l'acide quinique (Extrasynthèse) en solution dans le méthanol, il provoque une réaction immédiate, avec dégagement d'azote gazeux.

La fin de la réaction est indiquée par l'apparition d'une coloration jaune persistante.

Au total, l'utilisation de 58 mmoles de MNTS sera nécessaire pour mener la méthylation à son terme.

Le quinate de méthyle apparaît de consistante huileuse. Après ajout de méthanol, il est évaporé à sec.

Le contrôle de la synthèse est effectué par R.M.N. car l'acide quinique n'absorbe pas en UV et il n'existe pas de révélateur de C.C.M. spécifique. Les données R.M.N du quinate de méthyle sont résumées dans le tableau 3.

V-3) synthèse d'acide -3, 4 carbométhoxy caféique.

Après essai avec la potasse, cette réaction est réalisée dans la pyridine, sous agitation dans la glace.

A 7,8 mmoles (1,5 g) d'acide caféique (Aldrich) en solution dans 5 ml de pyridine, sont ajoutés goutte à goutte 1,9 mmoles (0,3 ml) de chloroformate de méthyle (Janssen).

Après addition d'une solution aqueuse de KH_2PO_4 à 2 % (m/v) jusqu'à acidification du milieu, le précipité obtenu est lavé à l'eau puis séché.

Le contrôle par C.C.M. est effectué sur silice éluée par un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (4/6, v/v) puis sur polyamide éluée par du toluène (ce dernier permet une meilleure migration); l'observation est effectuée à 366 nm.

Les données R.M.N. de l'acide carbométhoxy-3,4 caféique sont résumées dans le tableau 4. Les données obtenues sur le spectre COLOC (tableau 5) sont intéressantes car elles permettent de confirmer l'attribution des carbones.

V-4) greffage direct par le DCC du quinate de méthyle avec l'acide carbométhoxy-3, 4 caféique.

A 1 mmole de quinate de méthyle (0,2 g) en solution dans 1 ml de pyridine, sont ajoutés à température ambiante 1 mmole (0,295 g) d'acide carbométhoxy-3, 4 caféique puis 2 mmoles (0,41 g) de DCC dissous dans 1 ml de pyridine. Après sonication 10 minutes, on laisse 12 heures au repos.

L'ajout d'acétate d'éthyle à la phase réactionnelle permet d'éviter la formation d'une solution visqueuse (rencontrée dans une expérience précédente lors d'ajout d'eau, ceci ayant conduit à un rendement inférieur à 10%).

Après addition d'acétate d'éthyle et neutralisation par 3 mmoles de KH_2PO_4 en solution aqueuse à 2% (m/v), la phase organique issue du partage liquide-liquide est lavée à l'eau puis séchée par évaporation.

Le résidu est repris par un mélange méthanol/eau/acétone (15/10/10, v/v/v).

La déprotection des hydroxyles aromatiques s'effectue par hydrolyse de l'ester carbométhoxyque en milieu basique, ceci par addition de 3 mmoles de carbonate de potassium.

Le milieu est ensuite acidifié par 3,1 mmole de KH_2PO_4 , l'extraction est réalisée par l'acétate d'éthyle.

Le rendement global de cette réaction est de 68 %.

Le contrôle est effectué par C.C.M. sur polyamide éluée par un mélange eau/n-butanol/acétone/dioxane (75/15/10/5, v/v/v/v).

L'observation à 366 nm fait apparaître plusieurs composés. Le chlorogénate de méthyle est identifié par rapport à un témoin issu de l'extraction de *Meum athamanticum* mais il n'est pas le composé majoritaire.

La séparation des composés est effectuée sur une colonne de Sephadex éluée au méthanol; Les fractions obtenues sont contrôlées par C.C.M., dans les mêmes conditions que précédemment puis par R.M.N.

Le contrôle par R.M.N. fait apparaître le caféate de méthyle dans la fraction majoritaire. Les données R.M.N sont résumées dans le tableau 6.

V-5) synthèse d'acide méthoxyméthylène quinique.

A 1 mmole d'acide quinique (0,192 g) dans 4 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutées à température ambiante, sous agitation, 40 mmoles (4,4 ml) de triméthyl orthoformate (Janssen) et 1,26 mmoles (0,16 ml) de chlorure de triméthylsilyle (Janssen). Après une heure, 1 ml de pyridine est ajouté.

Les traces de pyridine du milieu réactionnel sont gênantes pour la migration lors de la C.C.M. Le milieu réactionnel est donc directement évaporé, puis repris dans le chloroforme.

Le rendement obtenu est de 66 %.

Les essais de contrôle par révélateur C.C.M. se sont tous soldés par des échecs. Pour vérifier la position du groupement protecteur, le greffage de résidus benzoyles rend le composé absorbant en UV :

A 0,5 mmole (115 mg) d'acide méthoxyméthylène quinique dans 4 ml de pyridine sont ajoutés 1,5 mmoles (0,17 ml) de chlorure de benzoyle (Janssen). La solution est laissée en contact 72 heures. Le milieu réactionnel est directement évaporé, puis repris dans le chloroforme.

La phase chloroformique est extraite trois fois par du carbonate de sodium. La phase aqueuse, après acidification par de l'acide chlorhydrique 6 N, est extraite par l'acétate d'éthyle.

Le contrôle de la réaction par C.C.M. est effectué sur silice éluée par un mélange hexane/acétate d'éthyle (5/5, v/v) après benzylation des hydroxyles libres du composé obtenu, qui est ainsi rendu absorbant en UV.

Le chlorure de benzoyle peut indifféremment estérifier les hydroxyles libres de l'acide méthoxyméthylène quinique, dans des proportions variables. Ceci amène l'apparition de plusieurs composés.

Ceux-ci sont séparés par une colonne de silice éluée par un mélange hexane/acétate d'éthyle (5/5, v/v). Le contrôle par R.M.N. des fractions fait apparaître des composés tri-, di- et mono-benzoylés, les masses obtenues après évaporation sont respectivement de : 2,2 , 5,8 et 10 mg. Le dérivé monobenzoylé est donc le produit majoritaire de la réaction.

Les données R.M.N. sont résumées dans le tableau 7. Le déblindage du proton 3 de l'acide quinique monobenzoylé situe le substituant benzoyle sur le carbone 3.

VI) analyse spectrale.

Tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AC 200.

Les spectres COSY, XHCORR et COLOC permettent l'attribution des protons sur les carbones correspondants. Pour les spectres COLOC, les paramètres ont été optimisés pour augmenter les couplages longue distance d'une intensité de 8 Hz.

Les spectres COLOC étudient la corrélation longue distance entre les carbones et les protons, par l'intermédiaire du nombre x de liaisons existant entre eux et noté x J dans les tableau présentés ci-après.

Ceci permet l'attribution, dans le cas où des carbones possèdent un déplacement chimique voisin. Ainsi, sur le spectre COLOC de l'acide carbométhoxy-3, 4 caféique (tableau 5), C-3 n'est corrélé avec un couplage 3 J qu'avec H-5 alors que C-4 montre des corrélations 3 J à la fois avec H-2 et H-6, ce qui confirme l'attribution relative des deux signaux.

Tableau 1 : données R.M.N ^1H et ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) du chlorogénate de méthyle.

Numérotation	^1H - δ (ppm), figure	^{13}C - δ (ppm)	J (Hz)
1	-	127,60	-
2	7,04, d.	115,10	$J_{2-6} : 1,9.$
3	-	146,77	-
4	-	149,60	-
5	6,77, d.	116,51	$J_{5-6} : 8,2.$
6	6,94, dd.	122,97	$J_{2-6} : 1,9; J_{5-6} : 8,2.$
7	7,52, d.	147,16	$J_{7-8} : 15,9.$
8	6,21, d.	115,01	$J_{7-8} : 15,9.$
9	-	168,29	-
1'	-	75,63	-
2'6'	2,0-2,25, m.	37,98 et 37,62	$J_{2'-3'} : 6,5; J_{5'-6'a} : 4,5;$ $J_{5'-6'e} : 7,5.$
3'	4,12, dd.	70,35	$J : 3,5$ et 6,5.
4'	3,73, dd.	72,58	$J_{4'-5'} : 7,5; J_{3'-4'} : 3,5.$
5'	5,26, ddd.	72,04	$J_{5'-6'a} : 7,5; J_{5'-6'e} : 4,5.$
7'	-	175,39	-
8'	3,68, s.	52,99	-

Tableau 2 : données COLOC (200 MHz, CD₃OD) du chlorogénate de méthyle.

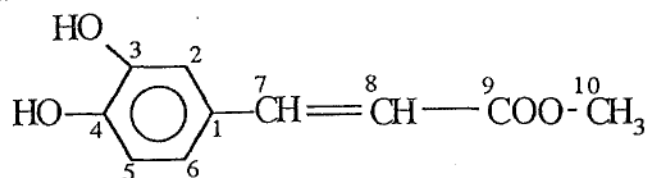
	C _{7'}	C ₉	C ₁	C ₆	C _{1'}
H _{2'-6'}	3 J	-	-	-	2 J
H _{8'}	3 J	-	-	-	-
H _{5'}	4 J	-	-	-	-
H ₈	-	2 J	3 J	-	-
H ₇	-	3 J	-	3 J	-
H ₅	-	-	3 J	-	-
H ₂	-	-	-	3 J	-
H _{3'}	-	-	-	-	3-J

Tableau 3 : données R.M.N ¹H et ¹³C (200 MHz, CD₃OD) du quinate de méthyle.

numérotation	¹ H-δ (ppm); figure	¹³ C- δ(ppm)	J (Hz)
1	-	76,75	-
2	2,00-2,15, m.	38,20	-
3	4,08, dd.	71,32	J :3,4 et 7,4.
4	3,41, dd.	76,44	J ₄₋₅ :8,6; J ₃₋₄ :3,4.
5	3,99, ddd.	68,08	J _{5-6a} :10; J ₄₋₅ :8,6; J _{5-6e} :4,5.
6a	1,85, dd.	41,67	J _{6a-6e} :13,2; J _{5-6a} :10.
6e	2,00-2,15, m.	41,67	-
7	-	175,66	-
8	3,72, s.	52,92	-

Tableau 6 : données R.M.N ^1H et ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) du caféate de méthyle.

Numérotation	^1H - δ (ppm); figure	^{13}C - δ (ppm)	J (Hz)
1	-	127,55	-
2	7,02; d.	114,71	$J_{2-6} : 1,9.$
3	-	146,81	-
4	-	149,69	-
5	6,76; d.	116,49	$J_{5-6} : 8,2.$
6	6,91; dd.	122,93	$J_{2-6} : 1,9; J_{5-6} : 8,2.$
7	7,52; d.	146,94	$J_{7-8} : 16.$
8	6,23; d.	115,07	$J_{7-8} : 16.$
9	-	169,77	-
10	3,73; s.	51,98	-

Tableau 7 : comparaison des données R.M.N ^1H (200 MHz, CD_3OD) de l'acide quinique, du quinate de méthyle et de l'acide quinique monobenzoylé.

composé	δH_3 (ppm)	δH_4 (ppm)	δH_5 (ppm)
acide quinique	4,01	3,38	3,98
quinate de méthyle	4,08	3,41	3,95
acide quinique monobenzoylé	4,87	4,06	3,84

DEUXIEME PARTIE :

INTERACTIONS

**CHLOROGENATE DE METHYLE -
MEMBRANES**

I) Introduction

Le mécanisme d'action des médicaments inhibiteurs des fonctions plaquettaires n'est pas toujours parfaitement connu ; ils inhibent souvent plusieurs aspects de la fonctionnalité plaquettaire *in vivo* et *in vitro* (Cazenave, 1983; Schorderet, 1992).

Une étude réalisée en 1988 sur la propriété antiagrégante de onze flavonoïdes a montré l'effet protecteur de ces composés par rapport à la peroxydation lipidique. Celle-ci est en effet largement impliquée comme agent pro agrégant plaquettaire dans le phénomène d'athérosclérose (Salvayre, 1988).

Une autre étude plus récente (1991) a montré que cinq flavonoïdes, de la classe des flavonols, inhibaient l'agrégation mais aussi le phénomène de sécrétion des plaquettes induites par des agents pro-agrégants (Tzeng, 1991). Une diminution de la sécrétion d'ATP et de thromboxane A₂ a été constatée, ce qui signifie que le mode d'action des flavonoïdes testés se situe sur la cyclo oxygénase, de la même manière que des médicaments comme l'aspirine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et le sulfinpyrazone

Une action membranaire a été décrite pour la quercétine, un flavonoïde de la classe des flavonols qui, comme le dipyridamole, inhibe la phosphodiesterase, et qui possède également un effet protecteur de l'intégrité vasculaire. Or on connaît l'importance des lésions vasculaires comme facteur proagrégant

L'augmentation d'AMPC qui résulte de l'inhibition de la phosphodiesterase agit en favorisant la séquestration du calcium, ce qui provoque un effet sur l'organisation structurale de la membrane. Ceci serait à l'origine de la perturbation des fonctions plaquettaires (Schorderet, 1992).

Une action sur des récepteurs protéiques a été décrite pour des ginkgolides, diterpènes et sesquiterpènes présents dans la feuille de Ginkgo Biloba. Leur effet antiagrégant a été montré par l'étude de l'inhibition de la liaison du Platelet Activating Factor à son récepteur plaquettaire (Schorderet, 1992).

La diversité des modes d'action des flavonoïdes provient du fait de la complexité du phénomène d'agrégation plaquettaire et des nombreux médiateurs chimiques impliqués. Ceci fait que le mécanisme d'action des médicaments inhibiteurs des fonctions plaquettaires n'est pas toujours parfaitement connu; souvent ils inhibent des fonctions plaquettaires à plusieurs niveaux.

Le but de cette partie est d'élucider par des techniques spectroscopiques (R.M.N. et R.P.E.) le mécanisme précis de l'effet antiagrégant plaquettaire du chlorogénate de méthyle constaté par Barron et al. (1983).

I-1) généralités sur la Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) et la Résonance Paramagnétique Electronique (R.P.E.)(Gremy, 1977).

La spectroscopie est un des nombreux domaines d'étude des interactions membranaires.

Les spectroscopies R.M.N. et R.P.E. étudient les transitions d'énergie entre les niveaux quantiques magnétiques nucléaires et électroniques.

En l'absence d'une induction magnétique extérieure, les moments magnétiques liés au spin de l'électron ou du noyau peuvent prendre toutes les orientations possibles : on dit que les niveaux magnétiques sont dégénérés.

Afin d'observer les transitions d'énergie, ces niveaux sont différenciés dans un champ magnétique qui lève la dégénérescence par effet Zeeman.

Le moment magnétique d'un noyau placé dans un champ magnétique possède un mouvement de précession, le mouvement de précession de Larmor.

Lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique qui irradie ce noyau atteint la fréquence de Larmor, une absorption d'énergie se produit et il y a résonance entre deux états de spin.

Il n'y a pas de différences fondamentales de principe entre la R.M.N. et R.P.E.; dans les deux cas l'échantillon à étudier est placé dans un champ magnétique et irradié par une onde électromagnétique, les phénomènes d'absorption d'énergie sont caractérisés par le spectre de résonance, constitué de raies plus ou moins larges. L'énergie mise en jeu est cependant très différente : il est plus difficile de modifier un spin nucléaire qu'un spin électronique.

Outre que l'une étudie les spins nucléaires et l'autre les spins électroniques, la différence technique entre les deux méthodes est qu'en R.M.N. le champ est constant et la fréquence varie alors qu'en R.P.E. c'est la fréquence qui est constante et le champ qui varie.

I-1-a) Les applications de la R.M.N.(Gremy, 1977).

La R.M.N. est une bonne technique d'analyse de composés inconnus. Son essor vient du fait qu'elle peut analyser des noyaux possédant un spin nucléaire non nul, ce qui est le cas de la majorité des noyaux atomiques existants, excepté le ^{12}C et le ^{16}O .

Les noyaux ^1H et ^{13}C , de spin $1/2$, satisfont aux conditions de résonance.

Grâce à ces noyaux la R.M.N. est utilisée en :

- chimie organique : elle est l'outil indispensable pour la détermination de structure moléculaire et du degré de pureté : elle a permis d'établir la conformation spatiale de molécules d'intérêt biologique (notamment des oses, des stéroïdes et des alcaloïdes).

Les progrès techniques permettent maintenant l'étude de la configuration des protéines en solution et l'observation des modifications de structure qu'elles subissent lorsqu'elles entrent en interaction avec les enzymes.

- médecine : l'imagerie R.M.N. permet de visualiser un organe (Cady, 1990).

- étude des membranes biologiques (Gorenstein, 1984), par spectroscopie du ^{31}P , du ^1H et du ^2H .

I-1-b) Les applications de la R.P.E. :

La majorité des molécules existantes possède un nombre d'électrons appariés dont les spins ont des sens opposés. Les électrons appariés rendent le moment magnétique électronique résultant nul. L'utilisation de la R.P.E. n'est donc pas possible pour la plupart des molécules.

Cette méthode présente donc de moins vastes applications que la R.M.N. Cependant lorsque cette technique a la possibilité d'être appliquée, elle permet la détection et l'étude de certaines espèces chimiques dans un milieu complexe, ce qui est le plus souvent impossible avec d'autres techniques spectroscopiques.

La R.P.E. possède une grande sensibilité : il est possible de détecter des concentrations très faibles de nitroxydes, de l'ordre de la micromole, dans des volumes d'environ 50 microlitres.

Cette sensibilité est largement plus importante que celle obtenue avec la R.M.N.

Les radicaux libres sont des composés instables ayant soit gagné soit perdu un électron. Leur moment magnétique n'est donc pas nul ce qui leur permet d'être étudiés par cette technique, ce qui a permis de préciser le mécanisme de réactions génératrices de radicaux libres (notamment des réactions d'oxydo-réduction au niveau de coenzymes flaviniques et quinoniques, qui passent par des intermédiaires radicalaires avec transferts d'électron et d'hydrogène).

Le remplissage incomplet des couches électroniques périphériques des métaux de transition fait que ces composés possèdent des électrons non appariés, de spin $1/2$ qui permettent leur étude par R.P.E.

Ceci a permis de déterminer la position des hèmes dans l'hémoglobine ainsi que la concentration intrahépatique de cytochrome P-450.

De nombreuses enzymes ont aussi été étudiées :

- des cytochromes et des peroxydases, par l'atome de fer.
- la xanthine oxydase, par l'atome de molybdène.
- la céruloplasmine, par l'atome de cuivre.

Une autre application de la R.P.E. est l'étude de la structure membranaire au repos ou en présence d'un effecteur physiologique ou pharmacologique.

Cette étude peut être purement structurale dans le domaine hydrophile organisé à proximité des têtes polaires, où en partie dynamique dans le domaine hydrophobe de la membrane.

Ceci est réalisable par la technique des marqueurs de spin, technique dans laquelle des sondes extrinsèques (qui sont des radicaux libres stables) sont ajoutées aux membranes.

I-2) Les membranes.

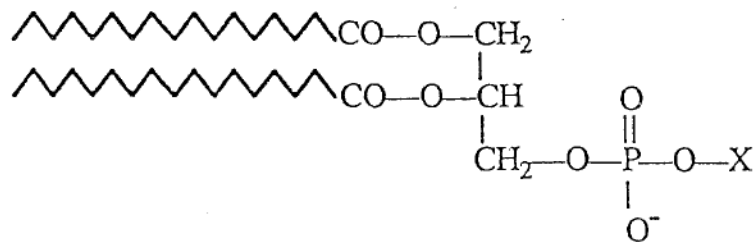
I-2-a) les membranes naturelles.

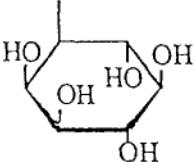
Le modèle membranaire est représenté par deux feuilletts phospholipidiques monocouches jointifs par leurs extrémités hydrophobes, alors que les groupements hydrophiles sont en contact avec le milieu aqueux, c'est à dire les faces extra- et intracellulaire de la membrane (Singer et Nicholson, 1972).

Les phospholipides membranaires possèdent une tête polaire et une queue apolaire.

La tête polaire comprend un groupe glycérol-phosphate, la queue apolaire est constituée de deux chaînes hydrocarbonées porteuses de doubles liaisons.

Les phospholipides naturels varient par le groupement présent sur la tête polaire ; ils sont représentés ci-dessous (d'après Shechter, 1990):



X =	—H	acide phosphatidique
	—CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	phosphatidylcholine
	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	phosphatidyléthanolamine
	—CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	phosphatidylsérine
	—CH ₂ —CHOH—CH ₂ OH	phosphatidylglycérol
		phosphatidylinositol

Outre la bicouche phospholipidique, la membrane possède :

- des protéines, qui y sont plus ou moins ancrées et qui donnent cet aspect de "mosaïque". Elles peuvent se positionner en surface de la membrane (protéines extrinsèques) ou à l'intérieur de celle-ci (protéines intrinsèques).
- des stérols qui forment le liant de l'architecture membranaire; Leurs groupements à la fois polaires et apolaires les rendent presque tous amphiphiles.
- des oses ils ne participent pas à proprement parler à la constitution de l'architecture membranaire, mais leur rôle est fondamental dans les processus de reconnaissance cellulaire.

La membrane est dite en mosaïque fluide car ses constituants sont mobiles les uns par rapport aux autres soit par diffusion latérale soit par diffusion transverse ("flip-flop").

I-2-b) les membranes modèles.

Les modèles membranaires synthétiques sont des phospholipides organisés en vésicules ou liposomes.

Deux sortes de membranes modèles ont été préparées dans ce travail :

- liposomes multilamellaires ou MLV (multi lamellar vesicles).

Ils s'obtiennent par agitation mécanique d'une suspension de phospholipides (purs ou additionnés de cholestérol) dans une solution aqueuse tamponnée. Pour leur homogénéité et leur parfaite anisotropie, ils doivent subir 5 ou 6 cycles de congélation-décongélation par passage de l'azote liquide dans l'eau chaude, tout ceci sous atmosphère inerte d'azote gazeux.

Leur taille est d'environ 200 nm.

- liposomes unilamellaires ou SUV (small unilamellar vesicles).

Ils sont préparés par sonication de MLV. De petite taille, environ 20 nm, les SUV sont rigides et indéformables.

I-2-c) rôle des membranes biologiques.

Les membranes biologiques peuvent jouer un rôle essentiel dans le mécanisme d'action des molécules d'intérêt pharmacologique, soit par des récepteurs spécifiques soit par un changement de fluidité globale (Seeman, 1972).

Le milieu membranaire, selon la drogue considérée, peut soit représenter le site d'action de la drogue (récepteur spécifique), soit représenter un obstacle à franchir pour l'expression de l'activité pharmacologique.

Ainsi, dans le premier cas, la drogue est intégrée dans le milieu membranaire : c'est le cas des drogues qui agissent sur les récepteurs adrénergiques.

Dans le second cas la drogue est transportée à travers la membrane; les antiviraux par exemple, qui ont une activité au niveau du noyau cellulaire, sont ainsi transportés de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur, où ils peuvent exprimer leur action pharmacologique.

L'équilibre entre les caractères hydrophile et hydrophobe d'une molécule conditionne son passage à travers la membrane (Leo, 1971).

La modification de la fluidité globale de la membrane peut aussi être le résultat de l'action d'une drogue. Par exemple, l'ajoène, drogue antiagrégante plaquettaire, provoque une légère fluidification de la membrane au niveau de la chaîne phospholipidique hydrophobe. La promazine, un dérivé de phénotiazine et la tétracaïne, un anesthésique local, possèdent également une action à ce niveau (Debouzy, 1989).

D'autres drogues telle que l'halothane, un anesthésique local, provoquent cet effet exclusivement au niveau de la tête polaire des phospholipides (Debouzy, 1989).

Par conséquent, un aspect fondamental de l'étude du mode d'action de la drogue est l'analyse des interactions entre la drogue et les constituants des membranes, en particulier les lipides.

II) ETUDE R.M.N. DES INTERACTIONS DU CHLOROGENATE DE METHYLE SUR DES MEMBRANES MODELES.

II-1) Etude de la structure et de la localisation en milieu membranaire de SUV du chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^1H .

Préparation des SUV : 50 μl d'une solution à 100 mg/ml de chloroforme de L- α -phosphatidylcholine (PC, Sigma) sont évaporés à siccité puis repris dans D_2O pour une concentration finale de 13,9 mM et soniqués pendant 3 heures.

L'addition de chlorogénate de méthyle (MeC, 2,1 mM) conduit à un rapport molaire PC/MeC de 7.

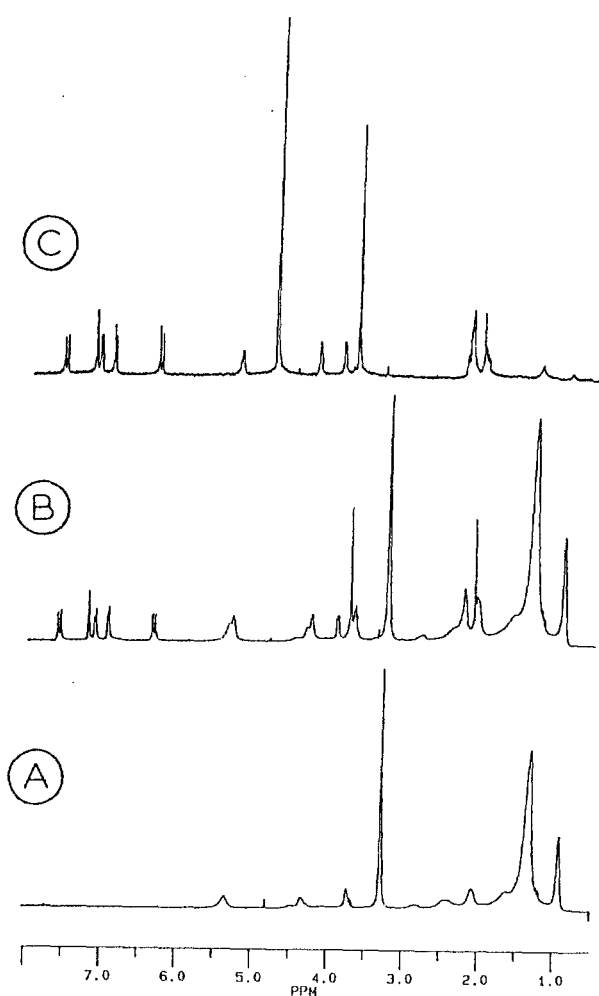


Fig. 1 : spectre ^1H -R.M.N.(400 MHz, D_2O , 25°C).

A) : spectre de SUV de PC.

B) : spectre de SUV de PC contenant du MeC (ratio molaire = 7).

C) : spectre de MeC pur (3 mM).

Le spectre B est une superposition des spectres A et C, toutefois les pics sont légèrement élargis.

L'attribution des pics de A) est la suivante : CH_3 (0,8 ppm); $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ (1,3 ppm); $-\text{CH}_2-\text{CO}$ (1,4 ppm); $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ (2,2 ppm); $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2,8 ppm); $\text{CH}=\text{CH}$ (5,5 ppm); CH_3 -choline (3,23 ppm); CH_2 glycérol (3,8-4,4 ppm).

Les effets d'ions manganèse sur les résonances des phospholipides de SUV (Chan et al., 1971) permettent de confirmer les hypothèses des interactions par quenching.

Chaque proton du groupement polaire que représente la choline résonne séparément pour chaque couche; Une légère addition d'ions est suffisante pour amener au dessous de la limite de détection le signal correspondant à la couche externe, tandis que les signaux correspondant à la couche interne ne sont pas affectés.

Inversement, les protons méthyles terminaux apparaissent en une seule résonance qui est progressivement diminuée par élargissement consécutif à l'addition d'ions manganèse.

La figure 2 présente les effets de l'addition d'ions manganèse sur le spectre de SUV, en absence et en présence de chlorogénate de méthyle.

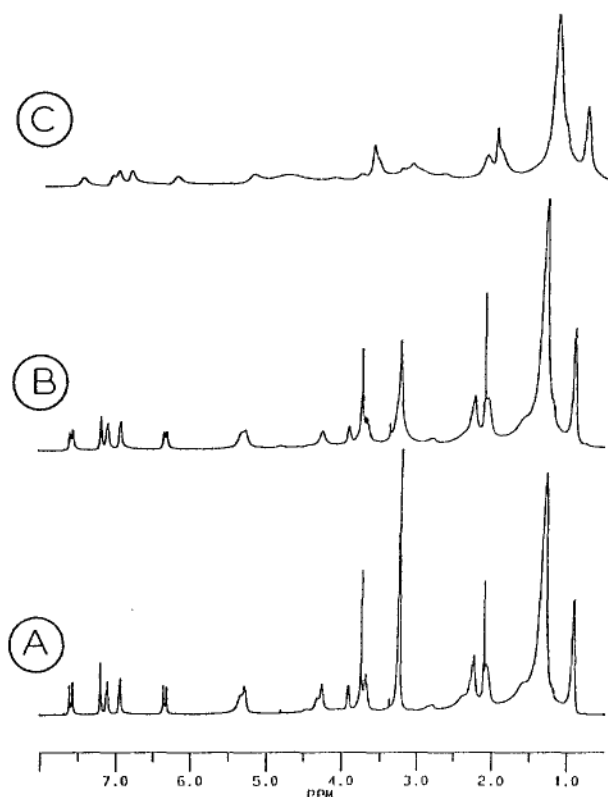


Fig. 2 : spectre ^1H -R.M.N.(400 MHz, D_2O , 25°C).

A) : SUV de PC en présence de MeC (ratio molaire = 7).

B) et C) : même spectre après addition dans le milieu de $2\ \mu\text{l}$ (B) et $10\ \mu\text{l}$ (C) de MnCl_2 0,1 M.

La diminution progressive de la hauteur des pics marqueurs du chlorogénate de méthyle à bas champ (conjointement au pic de la choline à 3,23 ppm) indique que le chlorogénate de méthyle ne situe pas dans la profondeur de la membrane. Si tel avait été le cas, la hauteur de ces pics aurait été conservée après l'addition de manganèse.

En conclusion, le chlorogénate de méthyle provoque une faible perturbation dans la membrane.

II-2) Etude de la structure membranaire au niveau des chaînes lipidiques en présence de chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^2H :

Cette expérience étudie la possibilité d'une interaction du chlorogénate de méthyle au niveau de la chaîne phospholipidique de la membrane.

L'introduction de deutérons qui remplacent certains protons portés par les atomes de carbone des chaînes grasses permet d'évaluer l'état d'organisation et la fluidité de ces chaînes plus ou moins profondément à l'intérieur de la membrane.

Le spectre ^2H -R.M.N. de SUV de dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC, Sigma Chemicals) contenant de l'acide stéarique perdeutééré apparaît comme une superposition de doublets de Pake qui correspondent aux groupes CD_2 de la chaîne lipidique (Seelig, 1977).

La modification de la valeur de l'écho quadrupolaire des deutérons proches du groupe glycérol (situé à l'extérieur) et de la valeur de l'écho quadrupolaire des deutérons proches de la partie terminale (situé à l'intérieur) est constatée en présence d'une drogue lorsqu'il se produit une interaction de celle-ci avec la membrane.

Ceci permet de localiser le niveau de l'interaction : à proximité de la tête polaire où au niveau de la chaîne hydrophobe.

Il a été ainsi montré dans des conditions identiques d'étude que l'interaction de l'ajoène, molécule anti agrégante plaquettaire, s'effectuait au niveau de la chaîne phospholipidique : la valeur de l'écho intérieur a diminué de 2 400 à 1 800 Hz (Debouzy, 1989).

La figure 3 présente le spectre du deutérium de SUV de DMPC en absence et en présence de chlorogénate de méthyle.

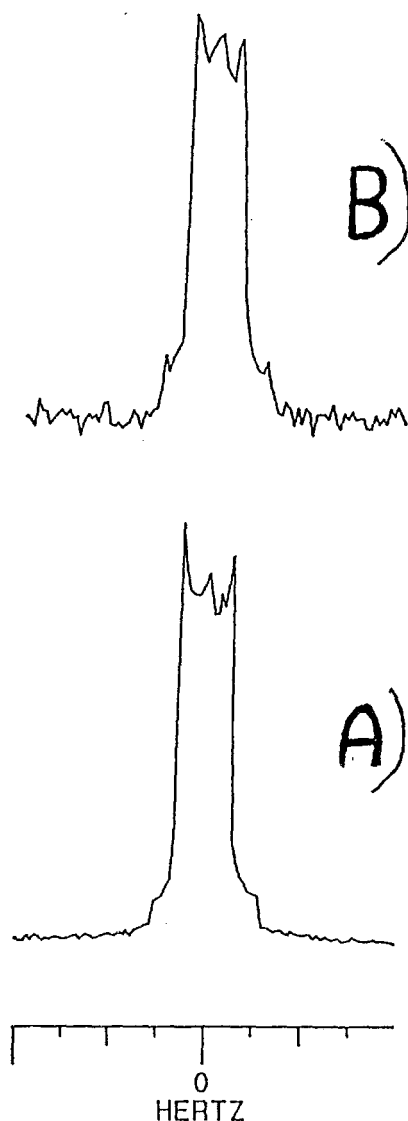


Fig. 3 : spectre ^2H -R.M.N.(400 MHz, D_2O , 25°C).

- A) SUV de DMPC (143,7 mM) contenant 10 % d'acide stéarique deutéré.
 B) idem, en présence de MeC (10,9 mM).

L'addition de chlorogénate de méthyle aux SUV ne produit aucun changement des échos : l'écho quadrupolaire extérieur est conservé à 1056 Hz; l'écho quadrupolaire intérieur est aussi conservé à 570 Hz.

Conclusion : cette expérience montre que l'action du chlorogénate de méthyle sur les chaînes lipidiques est nulle : la structure en bicouche lipidique et la fluidité sont conservées.

II-3) Etude de la structure membranaire au niveau de la partie polaire des phospholipides en présence de chlorogénate de méthyle par R.M.N. du ^{31}P :

Suite aux deux conclusions précédentes, à savoir que l'interaction du chlorogénate de méthyle ne s'effectuait pas sur les chaînes hydrophobes des phospholipides mais au niveau de la partie polaire, cette expérience étudie la possibilité d'interaction du chlorogénate de méthyle au niveau de la surface de la tête polaire des phospholipides.

En effet, le signal R.M.N. du phosphore lié à la tête polaire et contenu dans les systèmes modèles permet l'étude de la structure membranaire.

Si l'on considère un noyau de phosphore dans un champ magnétique, le δ sera différent selon ses orientations. Dans une membrane, on obtient 3 orientations moyennées partiellement : $1\sigma_{//}$ et $2\sigma_{\perp}$.

Les σ_{\perp} peuvent s'échanger rapidement (ce qui correspond à la rotation de la tête) et peuvent être moyennés par une composante unique σ_{\perp} à haut champ.

Ce n'est pas le cas entre $\sigma_{//}$ et σ_{\perp} . Les orientations sont différentes par rapport à la surface de la membrane : cela donne une composante large à bas champ.

L'écart maximal entre $\sigma_{//}$ et σ_{\perp} est l'anisotropie de déplacement chimique ou CSA (Chemical Shift Anisotropy), dont la valeur est comprise entre 43 et 50 ppm, et qui permet d'estimer directement la fluidité au niveau de la tête polaire.

Le spectre du ^{31}P de MLV de DMPC est caractérisé par une symétrie axiale et une anisotropie de déplacement chimique de 43 ppm, en accord avec une structure standard en bicouche lipidique à la température de 25° C (Gorenstein, 1983).

La modification de la symétrie axiale et de l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore reflète une perturbation au niveau de la tête polaire des phospholipides, notamment un changement de structure. La diminution de la composante σ_{\perp} est le signe d'une modification de la conformation. Ceci est obtenu par exemple par l'addition de molécules détergentes qui détruisent la structure.

La diminution du CSA à 34 ppm a été ainsi constaté pour la dibucaïne, un anesthésique local, ce qui a prouvé que l'interaction de la molécule s'effectuait à ce niveau (Wakita, 1992).

L'ajoène, lui, n'a présenté aucune modification du CSA par rapport au témoin : l'interaction membranaire qu'il provoque se situe donc bien au niveau des chaînes hydrophobes des phospholipides (Debouzy, 1989).

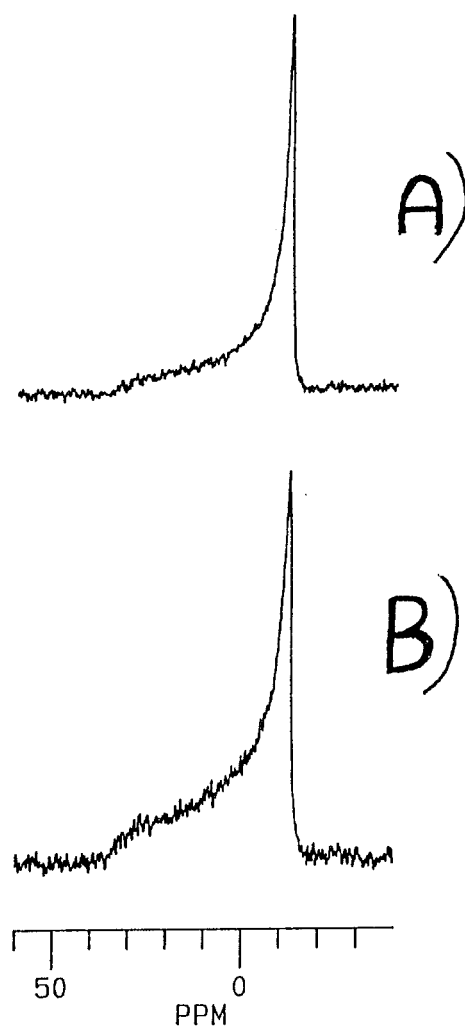


Fig. 4 : spectre ^{31}P (400 MHz, D_2O , 25°C).

A) : MLV de DMPC (72 mM).

B) : idem, après addition de MeC (rapport molaire = 10).

L'addition de chlorogénate de méthyle aux MLV ne modifie ni la symétrie axiale ni l'anisotropie de déplacement chimique du phosphore : la molécule ne perturbe donc pas la structure membranaire principale.

Néanmoins, un épaulement au niveau de $\sigma_{//}$ est constaté après addition de chlorogénate de méthyle.

Ceci est en faveur d'une interaction très superficielle, peut-être même à la limite du milieu aqueux extracellulaire.

III) ETUDE PAR R.P.E. DES INTERACTIONS MEMBRANAIRES DU CHLOROGENATE DE METHYLE SUR DES MEMBRANES NATURELLES.

III-1) La technique des marqueurs de spin (Gremy, 1977).

Le principe de cette technique est l'ajout d'acides gras marqués par des radicaux libres à des suspensions de membranes. Après addition de la molécule à étudier, l'ensemble est analysé à l'aide d'un spectromètre de R.P.E.

Les marqueurs, du fait de leur similitude avec les phospholipides, s'incorporent intimement dans la bicouche lipidique de la membrane. Ils agissent comme des sondes : par leur intermédiaire, les changements des propriétés physico-chimiques (rigidité et organisation structurale) subis par la membrane dans le voisinage du marqueur pourront être visualisés .

III-1-1) les marqueurs utilisés.

Les marqueurs utilisés en R.P.E. sont des radicaux libres stables à température ordinaire et dans les conditions habituellement utilisées dans l'étude des systèmes biologiques.

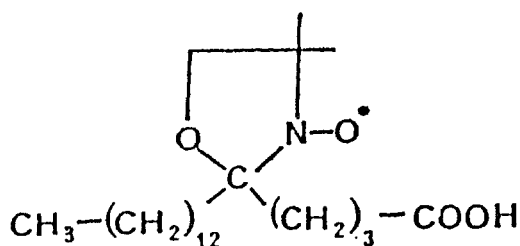
III-1-1-a) propriétés physico-chimiques des marqueurs.

Chimiquement dérivés de l'acide stéarique, les Nitroxy Stéarique (NS) portent une fonction nitroxyde qui est l'élément paramagnétique de la sonde.

La position de la fonction nitroxyde par rapport au carboxyle terminal de l'acide stéarique peut varier selon la profondeur membranaire que l'on désire étudier :

- le 5 NS explore la zone proche de la tête polaire des phospholipides.
- le 12 NS explore une zone médiane entre la tête polaire des phospholipides, zone très structurée et la queue hydrophobe qui présente un milieu fluide plus désorganisé.
- le 16 NS explore le domaine hydrophobe des phospholipides, domaine le plus désorganisé de la membrane.

Le 5 NS est le (carboxy-3 propyl)-2 tridécyl-2 diméthyl-4,4 oxy-3 oxazolidine dont la formule développée est représentée ci-dessous :



III-1-1- b) propriétés spectrales des marqueurs en R.P.E.

L'électron célibataire de la fonction nitroxyde est soumis au champ magnétique local dû au moment magnétique de l'atome d'azote (spin nucléaire), lequel s'ajoute vectoriellement au champ expérimental dans les trois directions de l'espace.

Le spectre du radical libre est donc formé de trois raies équidistantes et d'amplitudes très peu différentes.

Pour des raisons d'amélioration du rapport signal sur bruit, on enregistre la dérivée de l'absorption d'énergie en fonction du champ magnétique.

Lorsqu' il est inclus dans une structure lipidique fluide le spectre d'absorption du nitroxyde est formé de trois raies équidistantes et d'amplitudes très peu différentes. Il est dit isotrope.

Dans une zone lipidique rigide; le spectre s'élargit et devient fortement dissymétrique (ou anisotrope) car le nitroxyde présente des mouvements lents.

Dans un système visqueux tel que les membranes biologiques, la distance entre les raies peut atteindre jusqu'à 32 gauss.

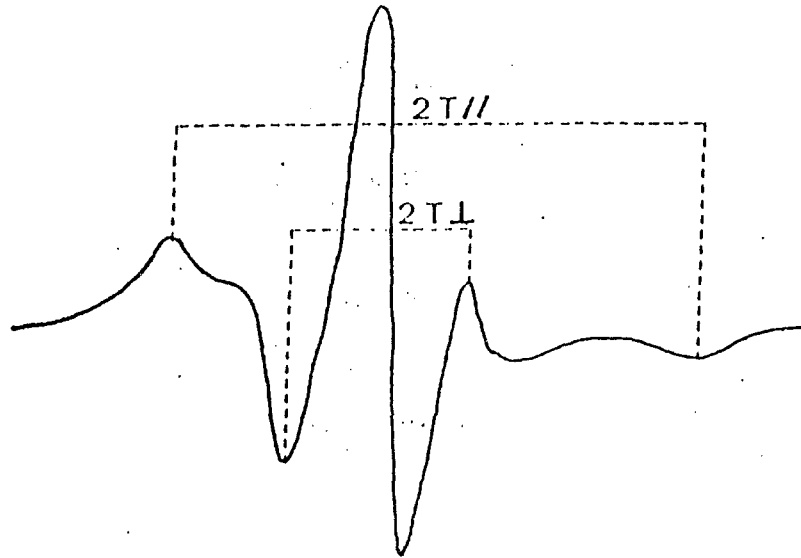
L'espace entre les raies du spectre anisotrope dépend de l'orientation de l'échantillon par rapport au champ magnétique :

- si le champ expérimental est parallèle à l'orbitale électronique de l'azote, il existe un couplage maximum entre eux et les trois raies sont très espacées (32 gauss).

- si le champ est perpendiculaire, le couplage est minimum et les trois raies sont proches des valeurs de référence de la constante de couplage (6 gauss).

L'intervalle entre les raies s'exprime sous la forme d'une constante de couplage $2 T_{//}$ (pour les orientations parallèles) et d'une constante de couplage $2 T_{\perp}$ (pour les orientations perpendiculaires).

Les constantes de couplage observés sur le spectre anisotrope d'un 5 NS sont représentées ci-dessous :



La comparaison de $2 T_{//}$ et $2 T_{\perp}$ par rapport aux valeurs théoriques dans un cristal ($2 T_{//th}$ et $2 T_{\perp th}$, 64 et 12 gauss) permet de définir un paramètre d'ordre S .

$$S = \frac{2 T_{//} - 2 T_{\perp}}{2 (T_{//th} - T_{\perp th})}$$

Compris entre 0 et 1, S est proche de 1 lorsque le système expérimental est parfaitement orienté.

Le paramètre d'ordre rend compte, par l'intermédiaire de la mobilité du marqueur, du degré d'organisation dans cette zone des phospholipides (Seelig, 1970). L'étude de la variation de sa valeur à $37^{\circ}C$ en présence de drogue permet de conclure quant à l'interaction produite.

Ainsi, une diminution du paramètre d'ordre à $37^{\circ}C$ est synonyme d'un effet fluidifiant de la membrane, tandis que l'augmentation de ce paramètre est synonyme d'un effet rigidifiant.

L'action fluidifiante de la membrane provoquée par l'ajoène a été démontrée par cette méthode (Debouzy, 1989).

III-1-2) mode d'enregistrement des spectres.

Le mode opératoire expérimental suivi dans toutes les expériences suivantes est celui-ci :

Les spectres sont enregistrés tous les 3°C de 0°C à 40°C sur un spectromètre VARIAN E 109 puis ils sont traités à l'aide d'un digitiseur HP 9874 A et d'un calculateur HP 9825 T.

Le spectromètre est équipé d'un système de régulation de température de l'échantillon à plus ou moins 0,1°C : cette régulation est obtenue en faisant passer un courant d'azote préalablement refroidi dans l'azote liquide, sur une résistance chauffante elle-même régulée.

Le nitroxyde utilisé ici, le 5 NS, est en solution dans le DMSO à une concentration de 10^{-2} M. La concentration est adaptée à la concentration en phospholipides de l'échantillon de manière à obtenir un rapport molaire entre les phospholipides et le marqueur de 50, et de manière à ne pas dépasser 2% en DMSO.

III-2) Etude par R.P.E. de l'action du chlorogénate de méthyle sur les membranes.

La composition physico-chimique des membranes des globules rouges peut être assimilée à celle des membranes plaquettaires. En effet, les radicaux sialiques des glycoprotéines situées à la surface externe des hématies (Boivin, 1987) sont retrouvés sur les glycoprotéines Ib_{α} , Ib_{β} , III_a , IIb_{α} , IIb_{β} et V des membranes plaquettaires (Nurden, 1983).

Par ailleurs, les globules rouges, plus faciles à obtenir en grande quantité, se conservent beaucoup plus longtemps que les plaquettes sanguines.

C'est pourquoi l'étude de l'interaction a été effectuée sur les hématies, d'abord sur les cellules entières, puis sur les membranes isolées, appelées encore "ghosts".

III-2-1) Etude par R.P.E. de l'interaction chlorogénate de méthyle - hématies.

Les propriétés fonctionnelles des globules rouges et notamment les propriétés rhéologiques et mécaniques peuvent être régulées par la fluidité de la membrane (Shiga, 1980).

Nous étudions ici la possibilité d'un effet du chlorogénate de méthyle sur les membranes des hématies.

mode opératoire : 200 μ l du culot d'hématies préalablement lavées sont placés dans un cône Eppendorf et marqués par de 2 μ l de 5 NS (Molecular probes) puis 1,8 ml de solution aqueuse isotonique de chlorogénate de méthyle à 10^{-3} et 10^{-4} M est ajoutée. 1,8 ml de sérum physiologique est utilisé pour le témoin, ce qui amène une concentration finale en chlorogénate de méthyle de $0,9 \times 10^{-4}$ et 9×10^{-5} M.

Après homogénéisation du milieu sur vortex, la solution est prélevée dans un microcapillaire.

Celui-ci est placé dans l'entrefer de l'aimant du spectromètre et les spectres sont enregistrés suivant la méthodologie décrite auparavant.

Les spectres obtenus sont digitisés et les paramètres spectraux déterminés. Nous traçons la droite de régression du paramètre d'ordre en fonction de la température. A partir des paramètres de cette droite nous pouvons calculer avec encore plus de précision le paramètre d'ordre à 37°C (S_{37}).

Aux deux concentrations étudiées, la valeur de S_{37} pour la concentration en chlorogénate de méthyle de 9×10^{-4} M est de 0,6502 et 0,6582 pour une concentration de 9×10^{-5} M.

Les valeurs des deux paramètres expérimentaux présentent une variation par rapport à la valeur du témoin (0,6523) inférieure à 1%, peu significative, mais la reproductibilité des résultats permet d'en tenir compte.

Cette expérience montre une très faible interaction du chlorogénate de méthyle sur les membranes des hématies, compte tenu de la faiblesse de la variation de la valeur du paramètre.

III-2-2) Etude par R.P.E. de l'interaction chlorogénate de méthyle - ghosts.

Les ghosts sont préparés suivant la méthode de Steck (1974).

a) essai de mise en évidence d'interaction par spectrophotométrie d'absorption dans l'U.V.

Le chlorogénate de méthyle peut absorber les longueurs d'ondes situées dans l'ultra-violet. Aux longueurs d'ondes inférieures à 300 nm se pose le problème d'absorption des acides aminés constitutifs des protéines extrinsèques présentes sur les membranes étudiées (notamment l'histidine) .

Le premier pic d'absorption du chlorogénate de méthyle, situé à 325 nm, est donc choisi comme pic marqueur car à cette longueur d'onde, les acides aminés n'absorbent pas et donc ne peuvent pas interférer.

L'absorbance des solutions témoins de chlorogénate de méthyle est mesurée sur un spectrophotomètre SHIMAZU MPS-2000, et permet de déterminer la limite de détection à 10^{-6} M.

3 solutions témoins de chlorogénate de méthyle à 10^{-4} , 10^{-5} et 5×10^{-6} M sont préparées. Leur absorbance à 325 nm est respectivement de 2,83 / 1,3 / 0,15.

4 ml des solutions de chlorogénate de méthyle sont ajoutés à 1 ml de suspension de ghosts, pour des concentrations finales en chlorogénate de méthyle de 2.66×10^{-4} , 10^{-4} et 10^{-5} M.

Après une heure d'incubation à 4°C et homogénéisation de l'ensemble puis centrifugation à 20 000 tours par minute, l'absorbance à 325 nm des solutions, lue sur 3 ml de surnageant, est respectivement de 1,53 / 0,17 / 0,1 . Les culots sont conservés et marqués par le 5 NS.

Les courbes de densité optique à 325 nm en fonction du logarithme de la concentration en chlorogénate de méthyle établissent une variation proportionnelle de densité optique par rapport à la concentration.

La densité optique des surnageants est diminuée par rapport à celle des solutions initiales.

Aux trois concentrations étudiées la valeur de la densité optique du surnageant représente 85% de la densité optique de la solution initiale.

Ceci semble établir la fixation du chlorogénate de méthyle sur les ghosts dans une proportion de 15%.

Suite à l'étude par spectrophotométrie dans l'UV, 200 μ l du culot de centrifugation sont placés dans un cône Eppendorf et marqués par de 2 μ l de 5 NS.

Après homogénéisation sur vortex, la suspension est prélevée dans un microcapillaire, celui-ci est placé dans l'aimant du spectromètre et les spectres sont enregistrés en suivant la méthodologie décrite auparavant.

Les valeurs du paramètre d'ordre à 37°C pour les 3 concentrations en chlorogénate de méthyle étudiées ($2,66 \times 10^{-4}$, 10^{-4} et 10^{-5} M) sont respectivement de 0,655 / 0,676 et 0,663.

Une variation non significative est constatée par rapport à la valeur de 0,652 du témoin même si un effet semble cependant se confirmer au niveau superficiel hydrophile de la membrane; celui-ci demeure très faible et nous amène à nous poser un certain nombre de questions, notamment sur les facteurs qui interviennent à ce niveau.

Le rôle membranaire des ions calciums est connu depuis longtemps, ainsi que ses modalités d'actions qui se situent exclusivement au niveau superficiel hydrophile. Nous avons donc décidé de reprendre l'étude de l'interaction du chlorogénate de méthyle sur des membranes contenant du calcium, d'autant plus que sa présence est nécessaire, notamment dans les phénomènes d'hémostase primaire et de contraction musculaire.

Les nombreuses études de l'effet de cations divalents sur des membranes ont montré que le calcium et dans une moindre mesure le magnésium augmentent la rigidité de ces membranes (Leterrier, 1978).

En plus de la rigidification, une modification de la distribution spatiale des phospholipides a été constatée, particulièrement lorsque des phospholipides acides sont présents (Viret, 1976). Il a été démontré que la liaison du calcium aux phospholipides acides s'effectue avec une grande affinité.

Dans l'expérience ci-dessous l'étude de l'interaction du chlorogénate de méthyle avec les ghosts tient compte de la présence physiologique du calcium dans toute membrane naturelle.

La concentration en calcium dans les échantillons a été fixée à une valeur constante de 2×10^{-3} M qui est proche des valeurs physiologiques.

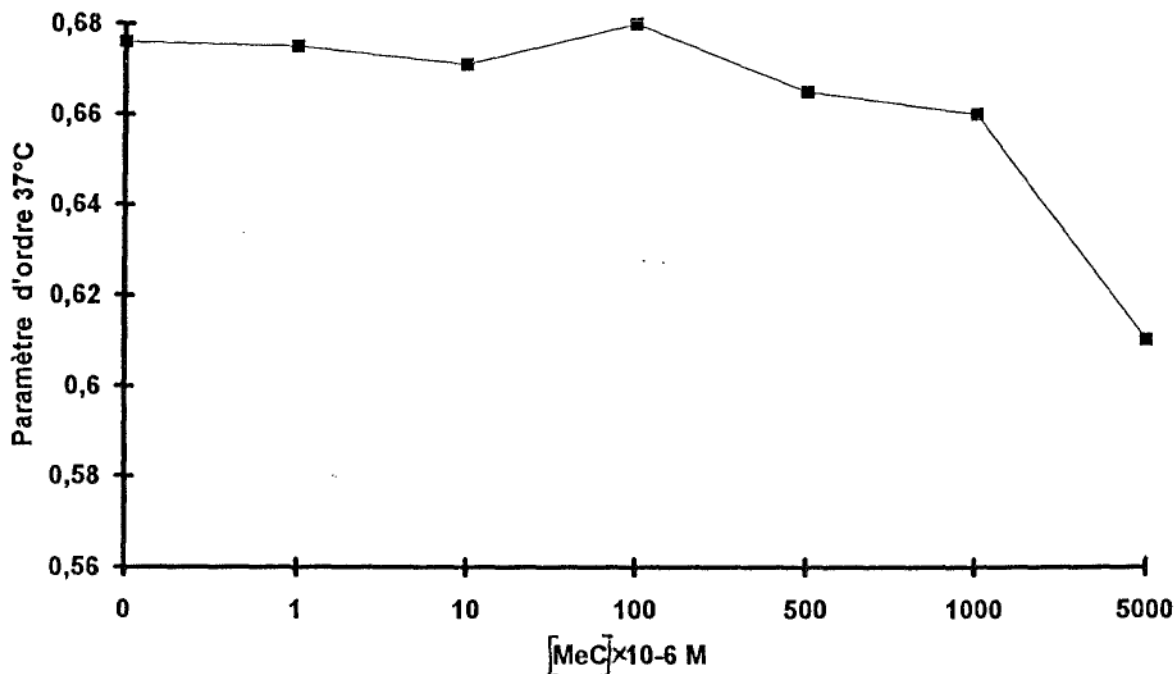
b) étude de l'interaction du chlorogénate de méthyle avec les ghosts.

L'ajout de 20 μl d'une solution de chlorure de calcium à 0,3 M aux 2,5 ml de solution aqueuse de chlorogénate de méthyle (de 6×10^{-3} M à $1,2 \times 10^{-6}$ M) et aux 500 μl de la suspension de ghosts conduit à des concentrations finales en chlorogénate de méthyle de : 0 (témoin), 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions, la solution de chlorogénate de méthyle est remplacée par de l'eau distillée.

Après une heure d'incubation à 4°C puis centrifugation (20000 tours par minutes pendant 20 minutes à 4°C), le surnageant est retiré et le culot marqué par le 5 NS, l'ensemble homogénéisé au vortex est prélevé dans un microcapillaire puis introduit dans l'entrefer de l'aimant du spectromètre de R.P.E. et ceci pour chaque concentration.

L'interprétation des résultats nous permet de tracer le paramètre d'ordre S en fonction de la température et à partir de la droite de régression calculer ce paramètre à 37°C . La courbe 1 représente ce paramètre en fonction du logarithme de la concentration.



courbe 1 : variation du paramètre d'ordre à 37°C en fonction du logarithme de la concentration en chlorogénate de méthyle.

Nous observons que l'augmentation de la concentration de chlorogénate de méthyle induit une diminution du paramètre d'ordre, hormis une seule valeur aberrante. Il est à remarquer que la variation observée est dose-dépendante.

La concentration de 5×10^{-3} M provoque l'effet le plus fort : à cette concentration le paramètre d'ordre subit une diminution de 10 % par rapport à la valeur du témoin (respectivement 0,676 et 0,616).

Cette variation de 10 % démontre que le chlorogénate de méthyle possède un effet légèrement fluidifiant sur la membrane.

c) étude de l'influence de la teneur en calcium.

L'étude de l'effet de la teneur en calcium est effectuée ici avec une concentration en chlorogénate de méthyle fixe (à 5×10^{-4} M), pour ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois.

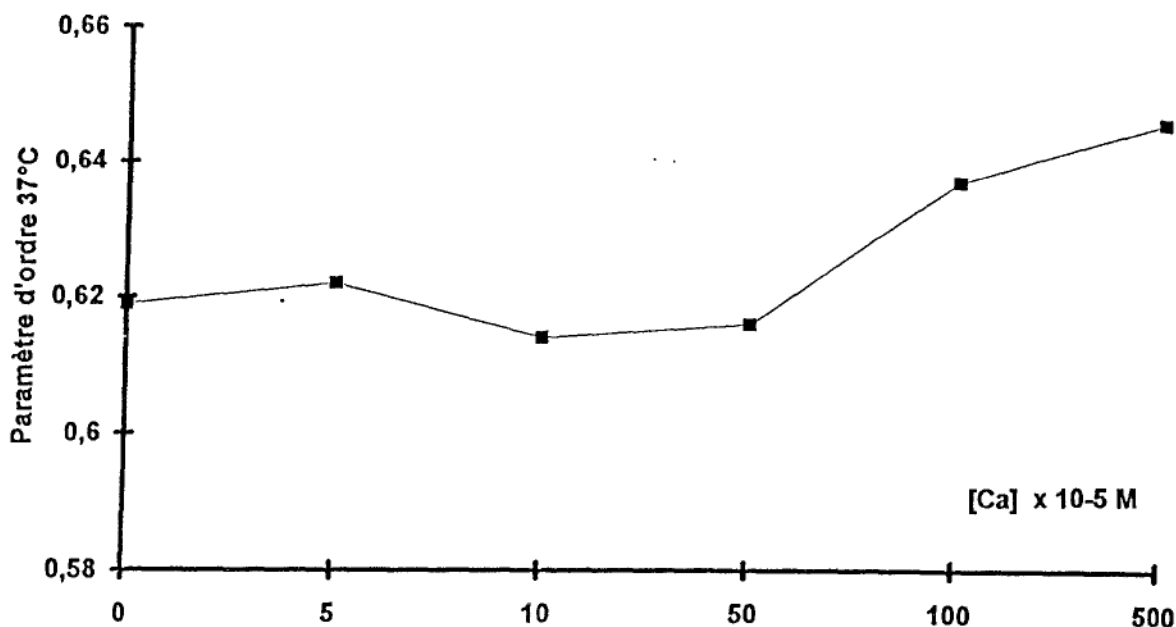
Une suspension de ghosts sans calcium résiduel est donc préparée (voir annexe).

Les solutions de chlorure de calcium sont préparées à partir d'une solution mère à 0,75 M par dilutions successives au dixième; L'ajout de 20 μ l de ces solutions aux 2,5 ml de solution aqueuse de chlorogénate de méthyle à 6×10^{-4} M et aux 500 μ l de la suspension de ghosts conduit à des concentrations finales en calcium de 0 (témoin), 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} et 5×10^{-5} M.

Après une heure d'incubation à 4°C, les tubes sont centrifugés (20000 tours par minute pendant 20 minutes, à 4°C).

Le surnageant est retiré et le culot marqué par le 5 NS, l'ensemble homogénéisé au vortex, prélevé dans un microcapillaire, est introduit dans l'entrefer de l'aimant du spectromètre de R.P.E.

La courbe 2 représente la variation du paramètre d'ordre à 37°C en fonction de la concentration en calcium.



courbe 2 : variation du paramètre d'ordre à 37°C en fonction de la concentration en calcium.

L'augmentation du paramètre d'ordre à 37°C est visualisée uniquement pour les concentrations en calcium les plus importantes (10^{-3} et 5×10^{-3} M)

Cette augmentation n'est pas significative : l'augmentation la plus forte, rencontrée à la concentration de 5×10^{-3} M n'est que de 3 % en valeur par rapport au témoin (respectivement 0,646 et 0,611).

Cette variation de 3 % est en faveur d'un effet fluidifiant, par antagonisme de l'effet rigidifiant du calcium que nous avons constaté sur la courbe 1.

Conclusion : les résultats des expériences effectuées ci-dessus ajoutées à ceux obtenus en R.M.N. démontrent, au vu des valeurs expérimentales, un effet légèrement fluidifiant du chlorogénate de méthyle; Cet effet est localisé au niveau de la partie polaire des phospholipides membranaires.

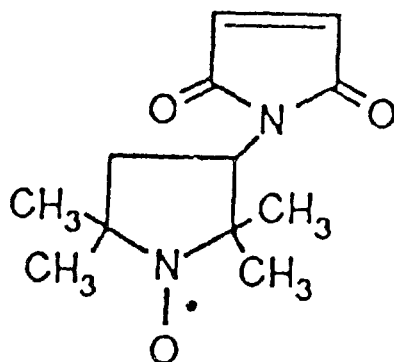
Ceci nous amène à poser l'hypothèse d'une interaction du chlorogénate de méthyle sur les protéines, étant donné les faibles modifications induites au niveau des phospholipides.

d) étude de l'interaction chlorogénate de méthyle - protéines de ghosts.

L'étude est réalisée suivant la méthode de marquage de Barber (1985).

Le marqueur paramagnétique utilisé est le tétraméthyl-2, 2, 6, 6 maléimido-4 pipéridino oxyde (4-Mal TEMPO), analogue structural d'acide aminé et porteur de la fonction nitroxyde.

Sa formule chimique est représentée ci-dessous :



Le 4-Mal TEMPO possède la propriété de se lier spécifiquement aux fonctions thiols des acides aminés protéiques (cystéine), en formant une liaison covalente. Un lavage permet d'éliminer le marqueur libre.

Son mouvement est principalement affecté par l'environnement du site de liaison.

Du fait de la grande taille des protéines, le mouvement du marqueur ne reflète pas le mouvement de la protéine entière (Shiga, 1980).

L'accessibilité des groupes thiols au marqueur, et par là-même la possibilité de leur liaison, est dépendante de la conformation tridimensionnelle que prennent les protéines dans l'espace.

La liaison du marqueur sur des thiols situés en surface provoque une faible immobilisation de ces groupes, ce qui laisse une forte mobilité du marqueur.

A l'inverse, la liaison en profondeur dans les poches de replis conformationnels de moindre accessibilité provoque une forte immobilisation de ces groupes, ce qui amène une faible mobilité du marqueur.

Le spectre de résonance du marqueur est analysé à partir des deux raies hyperfines situées à bas champ, la partie du spectre située à haut champ ne subit que de faibles variations.

Les deux raies à bas champ représentent deux populations de nitroxyde :

- la première raie, dite S, est caractéristique des marqueurs fortement immobilisés (strongly immobilized).
- la deuxième raie, dite W, est caractéristique des marqueurs faiblement immobilisés (weakly immobilized).

Le rapport W/S représente donc la répartition entre ces deux types de sites.

La courbe de W/S en fonction de la température est un indicateur sensible des variations conformationnelles des protéines (Barber, 1985).

Mode opératoire : Après addition de 200 μl d'une solution de marqueur (10^{-2} M dans le DMSO) à 19,8 ml de la suspension de ghosts et deux heures d'incubation à température ambiante suivies de centrifugation (20000 tours par minute pendant 20 minutes à 4°C), le surnageant est retiré.

Le culot est rincé par 20 ml de tampon d'hémolyse, l'ensemble homogénéisé au vortex est centrifugé dans les mêmes conditions. L'opération est répétée deux fois.

Après retrait du surnageant, les ghosts sont resuspendus dans 900 μl de tampon.

Une gamme de solutions de chlorogénate de méthyle est réalisée par dilutions successives au dixième d'une solution mère à 5×10^{-2} M.

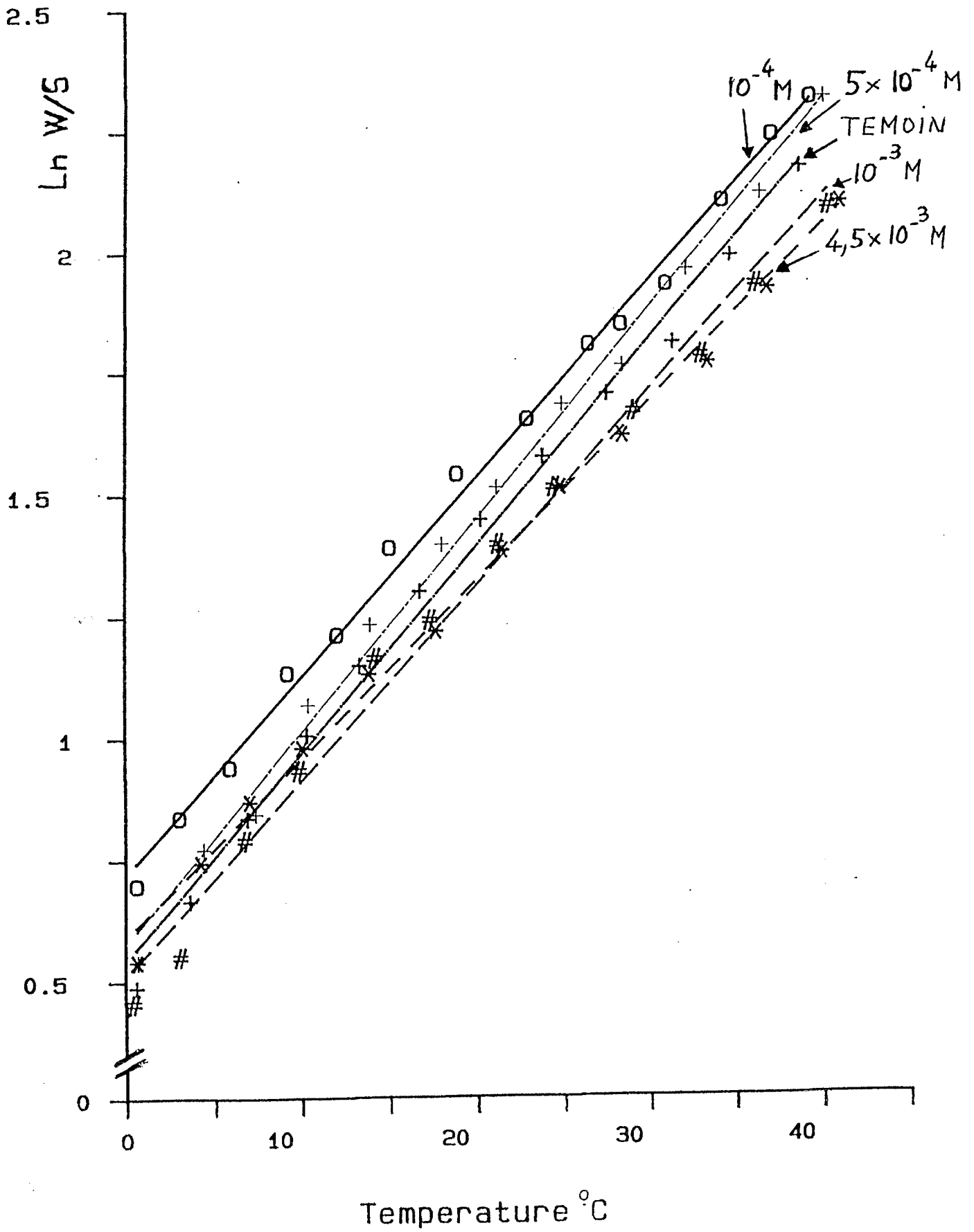
10 μl de solution de chlorogénate de méthyle sont ajoutés à 90 μl de solution marquée de ghosts.

Les concentrations finales de chlorogénate de méthyle dans les échantillons sont de 0 (témoin), $4,5 \times 10^{-3}$, 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} et 5×10^{-5} M.

Les échantillons sont analysés par R.P.E. suivant la procédure utilisée avec le 5 NS.

Sur les spectres, la hauteur de la demi-raie S est mesurée par rapport à la ligne de base, la hauteur de la raie W est directement mesurée pic à pic.

Le graphique 3 présente la variation du logarithme de W/S en fonction de la température (5×10^{-5} M n'est pas représenté).



Graphique 3 : variation du logarithme de W/S en fonction de la température.

La diminution vers le bas de l'échelle des ordonnées signifie que la mobilité globale du marqueur est diminuée, en ignorant si une des deux composantes W ou S est modifiée, ou si les deux composantes sont conjointement modifiées.

Les faibles concentrations (5×10^{-4} , 10^{-4} et 5×10^{-5} M) montrent un décalage par rapport au témoin, qui va dans un sens de l'augmentation de la mobilité globale du marqueur. L'absence d'effet à ces concentrations inférieures au millimolaire est une meilleure explication : ceci a été aussi constaté au cours des expériences précédentes.

La diminution de la mobilité globale du marqueur par rapport au témoin est constatée uniquement aux deux plus fortes concentrations en chlorogénate de méthyle ($4,5 \times 10^{-3}$ et 10^{-3} M).

Cette diminution est faible en valeur par rapport au témoin, ce qui signifie que l'effet sur la conformation des protéines provoqué par le chlorogénate de méthyle est faible.

Malheureusement, le marquage protéique, qui s'adresse exclusivement aux groupements thiols, n'est donc absolument pas spécifique.

L'hypothèse d'une interaction du chlorogénate de méthyle avec les protéines membranaires est donc vérifiée par cette expérience.

En fait, c'est l'accessibilité de la drogue aux sites superficiels des protéines qui est apparue diminuée.

Ce résultat semble confirmer une action superficielle membranaire.

III-3) Partie expérimentale : préparation des échantillons de R.P.E.

La préparation des échantillons de globules rouges et de ghosts d'hématies nécessite deux sortes de tampons :

- le tampon PBS (phosphate buffer saline), constitué d'une solution aqueuse de Na_2HPO_4 (Merck, masse moléculaire 358,14) 2,5 mM additionnée de 150 mM de NaCl (Merck, masse moléculaire 58,44).

Le pH de la solution résultante est ajusté à 7,4 par une solution aqueuse de NaH_2PO_4 5 mM (Merck, masse moléculaire 137,99) additionnée de 150 mM de NaCl.

- le tampon d'hémolyse, constitué par une solution aqueuse à 2,5 mM de Na_2HPO_4 , dont le pH est ajusté à 7,4 par une solution aqueuse de NaH_2PO_4 à 5 mM.

La teneur en sodium de ce tampon, 5 mM, est largement inférieure à un tampon isotonique.

Préparation des globules rouges :

Le sang veineux est prélevé dans des tubes de 10 ml contenant de l'EDTA potassique comme anticoagulant (système Vacutainer Becton Dickinson).

Après centrifugation des tubes à 2000 tours par minute, le surnageant est retiré par aspiration au moyen d'une trompe à eau, ainsi que l'interface avec les hématies, contenant des globules blancs et des plaquettes.

Le PBS est ajouté au culot, dans un rapport volumique 1/10.

L'ensemble est homogénéisé manuellement par lents retournements successifs afin d'éviter une hémolyse, puis centrifugé de la même manière que précédemment.

Le surnageant est retiré par aspiration et le lavage est renouvelé une seconde fois, de sorte que, après centrifugation et retrait du surnageant, les hématies obtenues peuvent être considérées comme exemptes des composés plasmatiques, notamment protéiques, et des autres molécules habituellement présentes dans le sang.

Préparation des ghosts :

Les ghosts sont préparés suivant la méthode de Steck (1974) par éclatement en milieu hypotonique, à partir d'une poche de concentré d'hématies pauvre en leucocytes (don du Centre de Transfusion Sanguine, La Tronche), resuspendues dans un milieu de conservation Saline Adénine Glucose-Manitol (SAG-Manitol).

Le contenu de la poche (environ 200 ml) est transféré dans des pots de centrifugation en matière plastique, de taille adaptée au rotor de type GSA de la centrifugeuse SORVALL RC-5B (Du Pont Instruments).

Le PBS, refroidi préalablement à 4°C, est ajouté, dans un rapport volumique 1/2.

Le récipient est fermé par un bouchon adapté, l'ensemble est homogénéisé manuellement par de lents retournements successifs et centrifugé à 4°C, à 2000 tours par minute, pendant 10 minutes.

Le surnageant, ainsi que l'interface constituée par les plaquettes et les globules blancs restants sont retirés par aspiration à l'aide d'une trompe à eau et, de la même manière que précédemment, un second lavage est effectué.

Les hématies sont alors correctement débarassées du milieu conservateur dans lequel elles se trouvaient.

70 ml de culot érythrocytaire ainsi obtenu sont incorporés sous agitation à 1,5 l de tampon d'hémolyse à 4°C. Après centrifugation (12 000 tours par minute pendant 20 minutes) le surnageant est retiré.

Les culots sont alors à nouveau dispersés sous agitation dans des volumes moindres (1 puis 0,5 l de tampon d'hémolyse) puis centrifugés.

Le volume total du tampon d'hémolyse utilisé est donc de 3 litres.

La dernière centrifugation (40 minutes à 20 000 tours par minute sur rotor SS-34) permet de concentrer les échantillons qui sont ainsi totalement débarassés de leur stroma et utilisables pour l'étude.

Les ghosts sont stockés à 4°C avant utilisation sous 48 heures, ou conservés à -85°C pour des utilisations ultérieures.

Préparation des ghosts sans calcium :

50 ml d'une solution aqueuse d'EDTA (Merck) à 20 mM sont ajoutés à la suspension de ghosts.

Après homogénéisation de l'ensemble par agitation mécanique, l'ensemble est centrifugé à 20000 tours par minute pendant 10 minutes.

Le surnageant est retiré à l'aide d'une trompe à eau, l'excès d'EDTA dans le culot est retiré en rinçant le milieu par le tampon d'hémolyse : après addition de 50 ml de tampon au culot de ghosts, l'ensemble est homogénéisé puis centrifugé; le surnageant est retiré et conservé en vue d'y doser le calcium résiduel.

Le culot est lavé deux nouvelles fois par la même procédure.

La méthode de dosage utilisée, complexation par l'ortho-crésol phtaléine (Hitachi 704 automatic analyser) présente une limite de détection de 2,02 mmole/litre, ce qui équivaut à 0,081 mg/ml.

Les résultats des dosages, effectués sur les surnageants de rinçage, indiquent une diminution progressive de la teneur en calcium.

Le deuxième surnageant possède une teneur en calcium inférieure à la limite de détection de la méthode, de même que le troisième.

Il est donc certain que le calcium endogène de la suspension de ghosts a été retiré en totalité.

CONCLUSION

La synthèse d'isomères du chlorogénate de méthyle, but initial de la première partie de ce travail, s'est avérée décevante. Par rapport aux méthodes décrites dans la littérature, seul l'isomère en position 5 a pu être synthétisé.

Il ressort néanmoins des résultats obtenus :

- que le greffage de l'acide carbométhoxy-3, 4 caféique avec le quinate de méthyle par le DCC n'a pas donné le résultat escompté : le caféate de méthyle a été obtenu à la place du chlorogénate de méthyle. Ce fait amena un certain nombre d'interrogations.

Une trans-estérification en caféate de méthyle aurait été causée par la méthode utilisée pour dissoudre les composés (sonication) et par l'instabilité du chlorogénate de méthyle en solution.

- que cette trans estérification a été favorisée pour le méthanol, alcool primaire, par rapport aux hydroxyles du quinate de méthyle, alcools secondaires.

La méthode a donc été mise en cause.

Les isomères en 3 et en 4 de l'acide chlorogénique n'existent pas dans le commerce. Si tel avait été le cas, la synthèse des esters méthyliques aurait été possible car cette réaction est aisée. Le chlorogénate de méthyle a été ainsi synthétisé : le groupement carboxylique de l'acide chlorogénique commercial est estérifié directement par le méthanol.

Une protection de deux hydroxyles quiniques a été ensuite recherchée pour estérifier directement le troisième hydroxyle, resté libre.

Le triméthyl orthoformate permet d'obtenir l'acide méthoxy méthylène quinique à partir d'acide quinique; la protection des hydroxyles pourrait s'effectuer en position 4 et 5 du quinate de méthyle.

Le principe peut être étendu à la synthèse d'acide caféoyl-3 quinique par greffage direct, sans utilisation du DCC

La protection des hydroxyles du quinate de méthyle pour le greffage à l'acide caféique reste donc à approfondir, en vue de la synthèse d'isomères du chlorogénate de méthyle.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons tenté de préciser l'action du chlorogénate de méthyle sur des membranes.

Les études par R.M.N. de l'interaction de ce composé avec des membranes modèles ont fourni des indications sur la profondeur membranaire impliquée.

- Le spectre R.M.N. du deutérium a démontré qu'il n'existe aucune interaction au niveau de la chaîne hydrophobe des phospholipides et ce, contrairement à l'ajoène, substance naturelle issue de l'ail.

- Les spectres R.M.N. du proton et du phosphore ont démontré que l'interaction semble s'effectuer en surface de la partie la plus polaire des phospholipides.

Les études par R.P.E. de l'interaction du chlorogénate de méthyle sur des membranes naturelles (ghosts d'hématies) ont permis de préciser le lieu de l'interaction déjà constatée en R.M.N.

- Les spectres de R.P.E. ont montré que le chlorogénate de méthyle possède un effet légèrement fluidifiant au niveau de la tête polaire des phospholipides.

- L'hypothèse d'une interaction du chlorogénate de méthyle avec les protéines membranaires a donc été formulée, et en partie vérifiée par la dernière expérience, par marquage des protéines. Cela pourrait expliquer les résultats de toutes les expériences précédentes.

L'étude de l'action propre du composé sur des protéines n'a pas pu être réalisée en raison du manque de spécificité de la méthode de marquage.

Elucider le mécanisme précis de l'effet antiagrégant plaquettaire du chlorogénate de méthyle constaté par Barron et coll. (1983), était le but de ce travail. Nous avons pu préciser le niveau membranaire de l'action de ce composé.

La poursuite de ce travail devra donc définir si cette action membranaire est en relation avec l'effet sur l'agrégation et devra porter sur la partie protéique des membranes.

BIBLIOGRAPHIE

Barber M.J., Solomonson L.P., Eichler D.C.

Spin labeled erythrocytes membranes : direct identification of nitroxide-conjugated protéins.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 27, (3), 793-798, 1985.

Barron D.

Etude du rhizome de *Meum athamanticum* Jacq. (Ombellifères).

Thèse de 3ème cycle, U.E.R. pharmacie, Université Scientifique Technologique et Médicale de Grenoble-1, 1982.

Barron D., Ibrahim R.K.

Synthesis of flavonoid sulfates: I; Stepwise sulfation of positions 3, 7, and 4' using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and tetrabutylammonium hydrogen sulfate.

Tetrahedron, 43, (22), 5197-5202, 1987.

Barron D., Kaouadji M., Mariotte A.M.

Etude du rhizome de *Meum athamanticum* Jacq. (Ombellifères)

in comptes rendus du 108^e congrès national des sociétés savantes Grenoble 1983, section des sciences fascicule III, C.T.H.S. Paris, 269-276, 1983.

Barron D., Kolodie L., Mariotte A.M.

Mise en évidence d'une activité antiagrégante plaquettaire *in vitro* chez les Ombellifères. I : *Meum athamanticum* Jacq.

Plantes médicinales et phytothérapie, XVII, (2), 107-113, 1983.

Berliner L.J., Reuben J.

Biological Magnetic Resonance, Volume 9.

Plenum Press, New York, London, 1990.

Bernards M.A., Lewis N.G.

Alkyl ferulates in wound healing potato tubers.

Phytochemistry, 31, (10), 3409-3412, 1992.

Black T.H.

The preparation and reactions of diazomethane.

Aldrichimica Acta, 16, (1), 3-10, 1983.

Boivin P.

Physiologie et métabolisme des globules rouges humains.

Encyclopédie Médico Chirurgicale, Paris, 13000 E¹⁰, 7, 1987.

Born G.V.R., Cross M.J.

Les plaquettes dans la thrombogénèse. Mécanisme et inhibition de l'agrégation des plaquettes.

Actual. Pharmacol., 18, 17-32, 1965.

Cady E.B.

Clinical Magnetic Resonance Spectroscopy.
Plenum Press, New-York and London, 1990.

Cazenave J.P., Hemmendinger S., Beretz A., Sutter-Bay A., Launay J.

L'agrégation plaquettaire : outil d'investigation clinique et d'étude pharmacologique. Méthodologie.

Ann. Biol. Clin. , 41, 167-179, 1983.

Chan S.L., Feigenson G.W., Seiter C.H.A.

Nuclear relaxation studies of lecithin bilayers.
Nature, 231, 110-112, 1971.

Debouzy J.C., Neumann J.M., Herve M., Daveloose D., Viret J, Apitz-Castro R.

Interaction of antiaggregant molecule ajoene with membranes. An ESR and ^1H , ^2H , ^{31}P study.

Eur. Biophys. J., 17, 211-216, 1989.

De Pooter H., De Brucker J., Van Sumere C.F.

Revised synthesis of 3-O- cinnamyl-, 3-O-p. coumaryl- and 3-O-isoferuloyl-D(-)-quinic acid.

Bull. Soc. Chim. Belg., 84, (8-9), 835-843, 1975.

De Pooter H., De Brucker J., Van Sumere C.F.

Synthesis of 3-O-o. coumaryl-, 4-O-o. coumaryl- and 3-O-feruloyl-D(-)-quinic acid.
Improved synthesis of 3-O-sinapyl-D(-)-quinic acid.

Bull. Soc. Chim. Belg., 85, (9), 663-671, 1976.

Felder E., Tiepolo U., Mengassini A.

Method for the esterification of carboxylic acids in gas chromatographic analysis.

Journal of chromatography, 82, 291-296, 1973.

Fisher E., Hoesch K.

Über die Carbomethoxy verbindungen der Phenolcarbonsäuren und ihre Verwendung für Synthesen, VII. Didepside der Oxynaphtoesäuren, Ferula- und o-Cumarsäure; Methyl derivative der Orsellinsäure.

Ann. Chem., 391, 347-372, 1912.

Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R.
Vogel's textbook of practical organic chemistry.
Longmann scientific and technical ed., U.K., 5th edition 1989.

Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., Debraux G.
Resources médicinales de la flore française.
Ed. Vigot frères, Paris, 910-912, 1961.

Gorenstein D.G.
Phosphorus 31 NMR : Principles and Applications.
Academic Press, New York, 1984.

Gremy F., Perrin J.
in *Eléments de biophysique*, tome II.
Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1977.

Henri S., Keith A.
Membrane properties of saturated fatty acid mutants of yeast revealed by spin labels.
Chem. Phys. Lipids, 7, 245-265, 1971.

Kume A., Tanimura H., Nishiyama S.-I., Sekine M., Hata T.
An improved procedure for the 2', 3'-O-methoxymethylation of N-protected ribonucleosides.
Synthesis, 408-409, 1985.

Kurzer F., Douraghi-Zadeh K.
Advances in the chemistry of carbodiimides.
Chemical reviews, 67, (2), 1967.

Leo A., Hansch C., Hlkins D.
Chem. Rev., 71, 525-616, 1971.

Leterrier F., Breton J., Daveloose D., Viret J., Le Saux F., Pollet S.
Physico-chemical state and calcium reactivity of normal and quaking mouse myelin.
Biochimica et Biophysica Acta, 507, 525-530, 1978.

Nurden A.T., Dupuis D., Rosa J.P.
Les glycoprotéines de la membrane plasmique plaquettaire.
Les plaquettes sanguines. in *Progrès en hématologie*, 4, Ed. Doin, 1983.

Salvayre R., Nègre A., Affany A., Lenoble M., Douste-Blazy L.

Protective effects of plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes.

In *Plant flavonoids in biology and medicine II : Biochemical, cellular, and medicinal properties*, 313-316.

Alan R. Liss Ed., New-York, 1988.

Shorderet M.

Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 2ème éd; Ed. Frison-Roche, Paris et Slatkine, Genève, 1992.

Seelig J.

Spin label studies of oriented smectic crystals (a model system for bilayer membranes).

J. Am. Chem. Soc., 92, 3881-3887, 1970.

Seeman P.

The membrane actions of anesthetics and tranquilizers.

Pharmacol. Rev., 24, 583-655, 1972.

Shechter E.

Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels.

Ed. Masson, Paris, 1990.

Shiga T., Maeda N.

Influence of membrane fluidity on erythrocytes functions.

Biorheology, 17, 485-499, 1980.

Singer S.J., Nicholson G.L.

Science, 175, 720, 1972.

Steck T.L., Kant J.A.

Preparation of impermeable ghosts.

Meth. Enzymol. 31, 172-180, 1974.

Talapatra B., Das A.K., Talapatra S.K.

Defuscin, a new phenolic ester from *Dendrobium Fuscescens* : conformation of shikimic acid.

Phytochemistry, 28, (1), 290-292, 1989.

Tanaka H., Nakamura T., Ichino K., Ito K.

A phenolic amide from *Actinodaphne Longifolia*.

Phytochemistry, 28, (9), 2516-2517, 1989.

Tzeng S.-H., Ko W.-C., Ko F.-N., Teng C.-M.
Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids.
Thrombosis Research, 64, 91-100, 1991.

Viret J., Leterrier F.
A spin label study of rat brain membranes. Effects of temperature and divalent cations.
Biochimica et Biophysica Acta, 436, 811-824, 1976.

Wakita L., Kuroda Y., Nakagawa T.
Interactions between local anesthetic Dibucaine and pig erythrocyte membranes as studied by proton and phosphorus-31 nuclear resonance spectroscopy.
Chem. Pharm. Bull., 40, (6), 1361-1365, 1992.

Zidovedski R., Banerjee U., Harrington D.W., Chan I.
NMR study of the interactions of polymixin B, Gramicidin S and Valinomycin with Dimyristoyllecithin Bilayers.
Biochemistry, 27, 5686-5692, 1988.

